

Efectes de l'exercici físic en l'envelliment: Implicació de la via de sirtuïna 1, el procés d'autofàgia i la via WNT en rata

Sergi Bayod Gimeno



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA I QUÍMICA TERAPÈUTICA

**EFFECTES DE L'EXERCICI FÍSIC EN
L'ENVELLIMENT: IMPLICACIÓ DE
LA VIA DE SIRTUÏNA 1, EL PROCÉS
D'AUTOFÀGIA I LA VIA WNT EN RATA**

SERGI BAYOD GIMENO

2013



UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA I QUÍMICA TERAPÈUTICA

**PROGRAMA DE DOCTORAT:
RECERCA, DESENVOLUPAMENT I CONTROL DE MEDICAMENTS**

**EFFECTES DE L'EXERCICI FÍSIC EN
L'ENVELLIMENT: IMPLICACIÓ DE
LA VIA DE SIRTUÏNA 1, EL PROCÉS
D'AUTOFÀGIA I LA VIA WNT EN RATA**

Memòria presentada per Sergi Bayod Gimeno per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Directors

Dra. Mercè Pallàs Lliberia

Dra. Anna Maria Canudas Teixidó

Doctorand

Sergi Bayod Gimeno



Aquest treball ha estat realitzat al departament de Farmacologia i Química Terapèutica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona i ha estat finançat per:

Ministerio de Educación y Ciencia (Fondos FEDER)
(projectes PSI2008-06417-C03, SAF-2009-13093 i SAF-2011-23631);

Instituto de Salud Carlos III
(projectes DPS2008-06998-C01,C02 i PI080400);

Generalitat de Catalunya
(projecte 2009/SGR00893);

Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED)
(projecte 610RT0405)

Portada: Estàtua del soldat Filípides anunciant la victòria grega.

Museu del Louvre, París (França). Obra de Jean-Pierre Cortot, 1834.

“Guanyar és vèncer-se a un mateix. Vèncer el nostre cos, els nostres límits i les nostres pors. Guanyar vol dir superar-se un mateix i fer realitat els somnis.”

Kilian Jornet (Skyrunner)

La ‘cursa’ del doctorat va començar l’any 2008. Des d’aleshores, han sigut gairebé 5 anys de feina, que ara acaben amb la presentació d’aquesta tesi. Recordo què al principi no va ser fàcil, però poc a poc les coses van anant sortint. Abans de seguir, voldria destacar una de les meves passions més importants, el *running*. Aquest esport, ha forjat en mi dues qualitats que m’han ajudat sempre en la meva vida: l’esperit de superació i la força de voluntat per aconseguir els objectius proposats. Així, gràcies a aquestes dues qualitats, i com no, amb l’ajuda dels meus companys de laboratori, he tirat endavant el meu objectiu, fer un doctorat. I ves per on, ara estic a punt de creuar la línia d’arribada del meu doctorat.

El meu primer agraïment és per als doctors Mercè Pallàs i Toni Camins. Gràcies per acceptar-me al vostre grup de recerca i per permetre’m poder realitzar la tesi amb vosaltres. Agrair de nou a Mercè Pallàs, a més de a la doctora Anna M^a Canudas, per tota la tasca desenvolupada com a directores de la meva tesi doctoral. A les dues, el meu més sincer agraïment. No voldria oblidar-me de la doctora Rosa M^a Escorihuela i els seus doctorands (Jaume i Sandra), sense la seva col·laboració no hauria segut possible la realització d’aquesta tesi doctoral. I en general, a tots els professors i professores dels diferents grups que integren la Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia.

Durant els meus anys de doctorat, he conegut grans companys de laboratori, amics amb els quals he viscut moments inoblidables i amb els que he après moltíssim. Voldria primer de tot destacar als que van ser els meus primers mestres, per ordre cronològic: Pizarro (Javier García), Marta Tajés y Javier Gutiérrez. Ells van ser els ‘culpables’ de que jo ara estigui a punt de presentar la tesi doctoral, i als quals estaré eternament agraït. Els següents de la llista són Pou (Jordi Pou) i David Àlvarez. Currantes com ningú i amb un gran sentit de l’humor, que sempre t’arrencaven un somriure cada dia al lab. Agrair també a Alba Rebollo, Emma Barroso i Lucía Serrano per l’ajuda (i els anticossos) que em van prestar en algun moment. Tos ells ja doctors/es, i recentment s’ha sumat al grup Aureli (Aurelio Vázquez de la Torre). Juntos comenzamos la aventura del doctorado, pero tu has acabado primero, enhorabuena Dr Aureli!

Als doctorands del meu grup, Luisa de Lemos i David Porquet que, junt amb l’Aureli, formem part del gran club d’atletisme, el ‘Pharmacology Team’. Agrair també als

altres integrants del club, Alberto Vicente, i a Miguel Baena. Company!, sigue trabajando en el lab con la misma ilusión como lo haces en las carreras. Als integrants que han sigut o que ho són dels altres grups de recerca del lab: al grup d'Amfetamines (Sara, Sònia, Andrés, Jose i Raúl) i de Farmacognòsia (Simona, Hadi, Renato, Enric). A Gemma Manich per la seva ajuda amb les immuns i el microscopi, i a tot el servei de l'estabulari de la facultat de Farmàcia.

Recordar als meus alumnes de treball dirigit (Sandra, Patrícia i Sara) i als italians Paolo i Ilario, gràcies per deixar-me ensenyar-vos la mica que sé.

A tota la gent que ha passat pel lab, i que junts hem compartit tants bons moments. En especial, a Caro i la seva parella, Roberto, muchas gracias por acogerme tan bien allá en México, no os olvidaré nunca; i també l'altra meva amiga mexicana, Saray.

A més de les últimes incorporacions al lab, Gemma, Natty, Jose M^a, Cristian, Pol, Nacho, Dimitri, Gaia, Miren, molts ànims a tots ells.

Als postdoc 'Xevi' Palomer, Fèlix Junyent, Ester Verdaguer i Jaume del Valle per compartir tots els seus coneixements. I a Sílvia i Mar, moltes gràcies per la vostra feina del dia a dia, imprescindible per al bon funcionament del lab... prometo no demanar-vos res més. Bueno sí, una última cosa, seguiu fent la feina com l'esteu fent fins ara.

Sense oblidar a la meva família. A mun pare i a ti mama, per tot el suport donat en tots els anys d'estudi de la carrera i el doctorat. Gràcies per ensenyar-me a ser la persona que sóc. A la meua germana i a la seva parella, Alejandro. I també, a tots els meus amics del poble de Calaceit, amb els quals he compartit i comparteixo tantes bones estones.

No voldria concloure sense escriure unes paraules a la persona més especial que he conegut mai. Junt amb ella, estic vivint els millors moments de la meva vida... i els que ens queden. Tu em fas sentir una il·lusió indescriptible per tot allò que junts compartim. Tu vas despertar en mi sentiments que no sabia ni que existien. Amb tu he après a estimar. Per tot això, estic i estaré eternament agraït, il·lusionat, content, afortunat... i molts altres sentiments que descriuen el més profund sentiment de felicitat. T'estimo Laia, el meu 'amor de primavera'.

Índex	I
Abreviatures	III

INTRODUCCIÓ 1

1. L'envelliment en l'organisme 3

1.1 L'envelliment i les malalties neurodegeneratives	4
--	---

2. Estrès oxidatiu i malalties neurodegeneratives 5

2.1 Paper clau de la mitocondria	5
--	---

2.2 Estrès oxidatiu, dany oxidatiu i malalties neurodegeneratives	6
---	---

3. Exercici físic 10

3.1 Definició i beneficis sobre la salut	10
--	----

3.2 Estudis en humans i rosegadors	12
--	----

3.3 Mecanismes moleculars implicats en els efectes de l'exercici físic a nivell cerebral	14
--	----

3.4 Mecanismes moleculars implicats en els efectes de l'exercici físic a nivell perifèric	20
---	----

3.5 Exercici voluntari vs forçat: efectes a nivell cerebral	24
---	----

4. Vies moleculars implicades en el procés d'envelliment 26

4.1 Sirtuïnes	26
---------------------	----

4.1.1 Sirtuïna 1	27
------------------------	----

- Característiques	27
--------------------------	----

- SIRT1, envelliment i malalties neurodegeneratives	29
---	----

- SIRT1, malalties metabòliques i cardioprotecció	32
---	----

4.2 El procés d'autofàgia	35
---------------------------------	----

- Introducció	35
---------------------	----

- Mecanismes moleculars en l'autofàgia (macroautofàgia)	37
---	----

- Autofàgia, envelliment i malalties neurodegeneratives	41
---	----

- Autofàgia, envelliment, malalties metabòliques i cardioprotecció	46
--	----

4.3 La via Wnt	48
----------------------	----

- Introducció	48
---------------------	----

- Mecanismes moleculars en la via canònica Wnt	49
--	----

- Via canònica Wnt, envelliment i malalties neurodegeneratives	51
--	----

OBJECTIUS	55
RESULTATS	59
PUBLICACIÓ 1: <i>Long-term treadmill exercise induces neuroprotective molecular changes in rat brain</i>	61
PUBLICACIÓ 2: <i>Long-term physical exercise induces changes in sirtuin 1 pathway and oxidative parameters in adult rat tissues</i>	77
PUBLICACIÓ 3: <i>Autophagic processes were differentially modulated by long-term moderate exercise in rat brain and peripheral tissues</i>	93
PUBLICACIÓ 4: <i>Wnt Pathway regulation by long-term moderate exercise in rat hippocampus</i>	133
DISCUSSIÓ	169
1. Estudi de la via de sirtuïna 1 i la biogènesi mitocondrial a nivell cerebral i perifèric	172
2. Estudi del procés neurodegeneratiu	176
3. Estudi de l'angiogènesi, el dany oxidatiu i la maquinària antioxidant a nivell perifèric	178
4. Estudi del mecanisme d'autofàgia (macroautofàgia) a nivell cerebral i perifèric	182
5. Estudi de la via Wnt (via canònica) a nivell de l'hipocamp	187
6. Resum dels efectes de l'exercici físic a nivell cerebral i perifèric	191
- Efectes a nivell cerebral	191
- Efectes a nivell perifèric	191
CONCLUSIONS	195
BIBLIOGRAFIA	199
Annex 1. PUBLICACIÓ 5: <i>Physiological and behavioural consequences of long-term moderate treadmill exercise</i>	239

AMP: Adenosine monophosphate	Lef: Lymphocyte enhancer factor
AMPK: AMP-activated protein kinase	LKB1: Liver kinase B1
APC: Adenomatous polyposis coli	LRP5/6: Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6
APP: Amyloid precursor protein	LTP: Long-term potentiation
ATP: Adenosine triphosphate	LXR: Liver X receptor
Axina: Axis inhibition protein	MCI: Mild cognitive impairment
BAX: Bcl-2-associated X protein	MDA: Malondialdehyd
BCL-2: B-cell lymphoma-2	mtDNA: DNA mitochondrial
BDNF: Brain-derived neurotrophic factor	mTOR: Mammalian target of rapamycin
β-TrCP: β-transducin repeat-containing protein	NAD⁺: Nicotinamide adenine dinucleotide
CAT: Catalasa	NAMPT: Nicotinamide phosphoribosyltransferase
CDK5: Ciclin-dependent kinase 5	NFTs: Neurofibrillary tangles
CK1: Casein kinase 1	NF-κB: Nuclear factor-κB
CS: Citrat sintasa	NGF: Nerve growth factor
DKK-1: Dickkopf-1	NMDA: N-metil-D-aspartat
DNA: Àcid desoxiribonucleic	8-OHdG: 8-hidroxideoxiguanosina
DVL (o Dsh): Dishevelled	OXPHOS: Oxidative phosphorylation
ELA: Esclerosi lateral amiotròfica	p70S6K: p70S6 kinase
FOXO: Forkhead box proteins	PGC-1α: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
FRAP: Ferric reducing ability of plasma o Ferric reducing antioxidant power	PHF: Paired helical filaments
GD: Gir dentat	PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase
GPx: Glutatió peroxidasa	PKA: Cyclic AMP-dependent Protein kinase A
GSK-3α/β: Glycogen synthase kinase-3 alpha/beta	RE: Reticle endoplasmàtic
4-HNE: 4-hidroxinonenal	RNS: Reactive nitrogen species
5-HT: 5-hidroxitriptamina o serotonina	ROS: Reactive oxygen species
Hsc 70: Heat shock cognate 70	RC: Restricció calòrica
IGF-1: Insulin-like growth factor 1	SIRT1: Sirtuïna 1
JNK: c-Jun amino-terminal kinase	SOD: Superòxid dismutasa
LAMP: Lysosome-associated membrane glycoprotein	TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances
LC3: Microtubule-associated protein 1 light chain 3	

Tcf: *T cell factor*

TSC1/2: *Tuberous sclerosis complex 1/2*

ULK1: *Unc-51-like kinase 1*

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

UPS: *Ubiquitin-proteosome pathway*

VO_{2max}: Capacitat aeròbica màxima o
màxim consum d'oxigen

INTRODUCCIÓ

1. L'envelliment en l'organisme

El terme envelliment fa referència al conjunt de canvis fisiològics i anatòmics que es desenvolupen en l'edat adulta, els quals produeixen un deteriorament en les funcions fisiològiques i en el manteniment de l'homeòstasi, conduint a un augment del risc de morbiditat i de mortalitat (Blagosklonny, 2007; Hung et al., 2010). Els processos que conduiran a aquest deteriorament s'agrupen en envelliment primari i secundari. L'envelliment primari o hereditari, és intrínsec a l'organisme, és a dir, els factors causants són inherents a l'individu o hereditaris. Aquest tipus varia àmpliament entre els individus, i a més, a nivell individual, afecta de manera diferent a sistemes, òrgans i cèl·lules. L'envelliment secundari o adquirit, fa referència als defectes i discapacitats causats per factors adversos de l'entorn, incloent les malalties adquirides i els traumes psíquics i físics. És difícil separar aquests dos tipus d'envelliment degut al nombrós grup de factors etiològics d'ambdós. Per exemple, alguns dels defectes inherents que fan a un organisme més vulnerable no es posen de manifest fins que aquest s'exposa a una situació adversa.

En les persones, les diferències en el procés d'envelliment són en part determinades genèticament, però són els factors com la nutrició, l'estil de vida i l'ambient en què ens trobem els que tenen una gran influència. Alguns autors estableixen l'envelliment primari com la primera causa, sent l'envelliment secundari el conjunt de processos patològics que es deriven del primari. Així, l'envelliment es caracteritza com un deteriorament en el rendiment i l'eficiència de les funcions biològiques i socials, i que en últim terme produeix la malaltia de l'individu. Dintre d'aquests canvis que es produeixen durant l'envelliment i que poden desencadenar una malaltia trobem: la disminució de la funció renal, la reducció de la funció pulmonar, l'augment de la pressió sanguínia sistòlica i una intolerància a la glucosa (Hung et al., 2010).

A nivell cel·lular, l'envelliment està associat amb un augment de l'estrès oxidatiu, deteriorament de la funció mitocondrial, escurçament dels telòmers, reducció dels sistemes de reparació del DNA i pèrdua de cèl·lules irremplaçables junt amb el descens de la regeneració tissular (Sahin i Depinho, 2010). És en el cervell on la pèrdua de neurones pot conduir a alteracions en les sinapsis i la xarxa neuronal, produint un deteriorament de les funcions cognitives i al desenvolupament de malalties neurodegeneratives (Bishop et al., 2010; Hung et al., 2010).

1.1 L'envelliment i les malalties neurodegeneratives

L'envelliment fisiològic o no patològic està associat amb un deteriorament de les funcions cognitives com la memòria declarativa, la fluïdesa verbal i la memòria de treball. Però aquest envelliment no ens afecta per igual a tothom. Mentre que hi ha persones que mantenen un bon rendiment intel·lectual en edats avançades (envelliment saludable), altres mostren un deteriorament cognitiu lleu o inclús demència (envelliment no saludable). Així, la vulnerabilitat del cervell a envellir és el resultat de la interacció entre factors genètics i l'entorn (Garrido, 2011).

L'estrès és un dels factors negatius de l'entorn més estudiat que augmenta la vulnerabilitat del cervell a envellir. Aquest es defineix com el conjunt de sistemes fisiològics que són activats en resposta a un factor o agent estressant real o potencial. Això conduirà a l'activació d'un conjunt de respostes hormonals i neuronals amb la finalitat de restaurar l'homeòstasi de l'organisme. Per tant, direm que l'estrès és una resposta adaptativa de l'organisme que ajuda a aquest a adaptar-se a una nova situació o repte. Però si aquesta resposta es manté més temps del necessari o és activada de manera crònica, poden tenir lloc un conjunt d'efectes perjudicials per a l'organisme, com són la immunosupressió, la disfunció muscular perifèrica i la mort neuronal. Per tant, l'estrès és un important factor de risc per produir un envelliment no saludable i augmentar el risc de patir la malaltia d'Alzheimer (Wilson et al., 2005). D'altra banda, una dieta saludable, la pràctica d'exercici físic o la realització de tasques que impliquin una demanda intel·lectual, poden conduir a un envelliment saludable del cervell. Tots aquests factors de l'entorn exerceixen les seves accions positives o negatives a nivell cerebral mitjançant la modulació de la plasticitat sinàptica o mitjançant la modulació d'altres factors que estan implicats indirectament en la plasticitat del cervell (Garrido, 2011).

Cal dir que l'edat és el principal factor de risc de les malalties neurodegeneratives, fent a les persones no tan sols més vulnerables a patir aquestes malalties, sinó que redueixen les seves capacitats d'autoreparació (Shetty et al., 2011).

A nivell molecular, quins són els factors o mecanismes moleculars que podrien estar implicats en l'inici del desenvolupament d'una malaltia neurodegenerativa?

Està ben establert que l'estrès oxidatiu, on la mitocòndria juga un paper molt important i del qual en parlarem més endavant, està relacionat amb el desenvolupament de malalties neurodegeneratives. Cal esmentar que algunes de les vies moleculars i

mecanismes que regulen el procés d'envelliment i l'esperança de vida podrien també estar implicats en el desenvolupament de les malalties neurodegeneratives, entre les quals destaquen: la via de la insulina/IGF-1, la via d'mTOR, la via de les sirtuïnes i la funció mitocondrial (Bishop et al., 2010).

2. Estrès oxidatiu i malalties neurodegeneratives

2.1 Paper clau de la mitocondria

La mitocondria, coneguda com la central energètica de la cèl·lula, és l'òrganul principal encarregat de proporcionar energia a la cèl·lula en forma d'ATP (*adenosine triphosphate*), mitjançant la via de fosforilació oxidativa (*oxidative phosphorylation* o *OXPHOS*). En aquest procés, els electrons alliberats de l'oxidació de diferents substrats pels complexos de la cadena respiratòria, són captats finalment per l'O₂ establint-se un gradient electroquímic utilitzat per produir finalment l'ATP. I és en aquest procés on es produeixen les espècies reactives d'oxigen o ROS (*reactive oxygen species*), dintre de les quals trobem compostos com el peròxid d'hidrogen (H₂O₂) i els radicals superòxid (O₂^{•-}) i hidroxil (OH[•]). El O₂^{•-} és el primer ROS que es forma i el precursor de la majoria de ROS. Aquest és metabolitzat a H₂O₂ per l'enzim antioxidant superòxid dismutasa (en el citoplasma, coure/zinc superòxid dismutasa, Cu,Zn-SOD; en la mitocondria, manganès superòxid dismutasa, Mn-SOD); però també pot reaccionar amb altres radicals com l'òxid nítric (NO[•]), produint les espècies reactives de nitrogen o RNS (*reactive nitrogen species*). El H₂O₂ es transforma a aigua pels enzims antioxidants catalasa (CAT), glutatió peroxidasa (GPx) i tioredoxina peroxidasa. Si el H₂O₂ no és metabolitzat, es pot transformar en radical hidroxil (OH[•]) en presència d'ions metàl·lics com el ferro i el coure. El OH[•] és un dels oxidants més potents de la natura, per tant, és molt important que la cèl·lula disposi d'un eficaç sistema d'eliminació del H₂O₂ i de mecanismes quelants d'ions (com les xaperones), que previnguin la formació d'aquest radical (Esiri, 2007; Lee i Wei, 2007; Marchi et al., 2012). Donat que la fosforilació oxidativa implica el 90-95% del consum d'O₂ de la cèl·lula, es considera a la mitocondria com la principal font de producció de ROS en les cèl·lules dels mamífers (Marchi et al., 2012).

2.2 Estrès oxidatiu, dany oxidatiu i malalties neurodegeneratives

Tant les ROS com les RNS participen en la modulació de diferents processos biològics, com el metabolisme i desenvolupament cel·lular, el control de la transcripció i la traducció, la resposta immune i el procés d'autofàgia. Així, la cèl·lula disposa a més dels enzims antioxidants, d'una sèrie de compostos amb activitat antioxidant (antioxidants metabòlics) com el glutatió, que en conjunt mantenen els nivells de ROS en condicions fisiològiques normals, establint un equilibri dels nivells prooxidants i antioxidants (Dasuri et al., 2012). Així, durant l'envelliment, es produeix un deteriorament dels sistemes antioxidants tant en les persones com en els diferents models animals utilitzats, produint un augment en la cèl·lula dels nivells de ROS (Dröge i Schipper, 2007). Parlem aleshores d'estrès oxidatiu, el qual produirà un dany oxidatiu de proteïnes, lípids, DNA i carbohidrats. I és aquest dany oxidatiu el que també afectarà a la mitocòndria, produint un dany a les proteïnes de la cadena respiratòria, als lípids de les membranes mitocondrials i al DNA mitocondrial (mtDNA), el qual codifica per a components de la cadena respiratòria. Tot això desencadenarà en un cercle viciós, en què la mitocòndria danyada produirà més ROS, els quals produiran un consum excessiu de la defensa antioxidant. Aquest fet, agreujarà més l'estat d'estrès oxidatiu, conduint a l'augment del dany de proteïnes, lípids i DNA. Això provocarà la disfunció cel·lular i incrementarà la susceptibilitat a desencadenar el mecanisme d'apoptosi en teixits amb una alta demanda energètica, com és el cervell i per tant, conduirà al desenvolupament de la malaltia neurodegenerativa (Dasuri et al., 2012; Lee i Wei, 2007; Lin i Beal, 2006; Liu et al., 2009a; Marchi et al., 2012) (Figura 1).

El cervell és un dels òrgans més vulnerable a l'estrès oxidatiu. D'una banda, les defenses antioxidants a nivell cerebral són baixes. A més, el cervell té un alt contingut d'àcids grassos insaturats, els quals són particularment susceptibles a la peroxidació, i disposa de nivells elevats de ferro, el qual participa en les reaccions de peroxidació. El fet que el cervell utilitzi com a font d'energia casi exclusivament la glucosa, explica perquè consumeix nivells elevats d'oxigen (aproximadament un 20% de la quantitat total utilitzada pels éssers humans). Un altra dada a considerar és que el 95-98% del total de ROS produïdes en el metabolisme aeròbic provenen de la cadena respiratòria mitocondrial, i que el 2-5% de l'oxigen consumit en la respiració mitocondrial esdevé ROS (Floyd i Hensley, 2002).

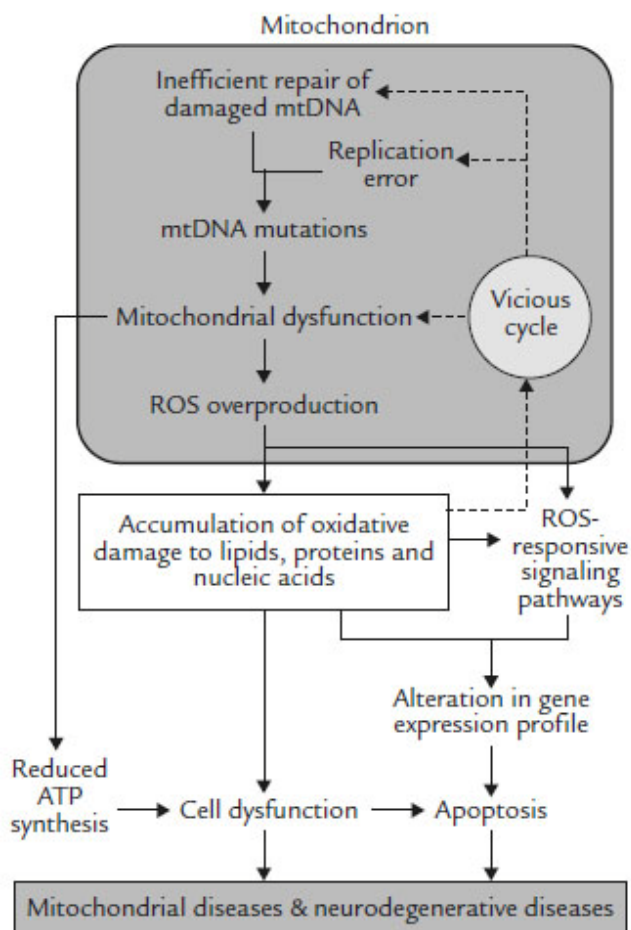


Figura 1. El paper de la mitocòndria en la progressió de la malaltia neurodegenerativa (Liu et al., 2009a).

En el cervell de malalts d'Alzheimer, Parkinson i esclerosi lateral amiotròfica (ELA), el dany oxidatiu per ROS és evident en regions específiques que pateixen neurodegeneració. Així, s'ha comprovat un augment del dany oxidatiu lipídic en el còrtex cerebral i en l'hipocamp de malalts d'Alzheimer, en la substància negra de malalts de Parkinson i en el líquid cerebrospinal de malalts d'ELA. També s'ha vist un augment del dany oxidatiu de proteïnes en l'hipocamp i neocòrtex de malalts d'Alzheimer, en els cossos de Lewy en la malaltia de Parkinson i en les motoneurones de malalts d'ELA (Andersen, 2004). Altres autors, han determinat en líquid cefaloraquídi de malalts d'Alzheimer, Parkinson, Huntington i ELA, una reducció de l'activitat d'enzims antioxidants com la superòxid dismutasa (Boll et al., 2008), junt amb un augment de l'oxidació de proteïnes, lípids i DNA, tant en el malalt d'Alzheimer com en la persona amb dèficit cognitiu lleu (MCI, de l'anglès *mild cognitive impairment*) (Mangialasche et al., 2009).

A nivell experimental, l'estudi de l'oxidació de proteïnes es realitza mitjançant la mesura de grups carbonils i la nitrosilació de proteïnes; l'oxidació de lípids o peroxidació lipídica, mitjançant la quantificació de productes com el 4-hidroxinonenal (4-HNE) i el malondialdehid (MDA), i també de les substàncies reactives de l'àcid tiobarbitúric (TBARS, de l'anglès *thiobarbituric acid reactive substances*); i com a mesura del dany al DNA, la 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) (Dasuri et al., 2012; Marchi et al., 2012).

Així, el deteriorament de la maquinaria antioxidant ocasionarà un dany oxidatiu, el qual produirà també alteracions en el plegament de proteïnes, mal funcionament del proteasoma, activació de les cèl·lules glials i processos apoptòtics, que en conjunt conduiran al desenvolupament de la malaltia neurodegenerativa (Federico et al., 2012). I és aquest mal plegament de proteïnes per estrès oxidatiu que conduirà a la formació d'agregats proteics en el sistema nerviós central. Així, en la malaltia d'Alzheimer trobem agregats de proteïna amiloide formant les plaques de β -amiloide extracel·lulars, i els cabdells neurofibril·lars (*neurofibrillary tangles o NFTs*) intracel·lulars formats per la proteïna tau hiperfosforilada; en la malaltia de Parkinson, agregats intracel·lulars d' α -sinucleïna formant part dels cossos de Lewy; agregats intracel·lulars de superòxid dismutasa en l'ELA; i en la malaltia de Huntington, agregats intracel·lulars de la proteïna huntingtina mutada (Ross i Poirier, 2004; van Ham et al., 2009).

Si ens centrem en la malaltia d'Alzheimer, se sap que és la malaltia neurodegenerativa més comuna, amb una prevalença entre 10-15% de la població major de 65 anys (Gustaw-Rothenberg et al., 2010; Mangialasche et al., 2009). Diferents estudis tant en humans com en models d'animals transgènics apunten a l'estrès oxidatiu com el factor clau que precedeix als canvis neuropatològics de la malaltia (Belkacemi i Ramassamy, 2012; Nunomura et al., 2006).

Cal recordar que el β -amiloide es genera pel processament proteolític del seu precursor, la proteïna precursora d'amiloide (*amyloid precursor protein o APP*). L'APP és una proteïna transmembrana implicada en diferents processos com l'adhesió cel·lular, la migració neuronal i la sinaptogènesi. Quan APP és processada per β - i γ -secretases (via amiloidogènica), es generen les formes tòxiques de β -amiloide, l' $A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$, les quals s'agregaran donant lloc finalment a les plaques de β -amiloide (Boddapati et al., 2011; Chow et al., 2010; Guo et al., 2012) (Figura 2).

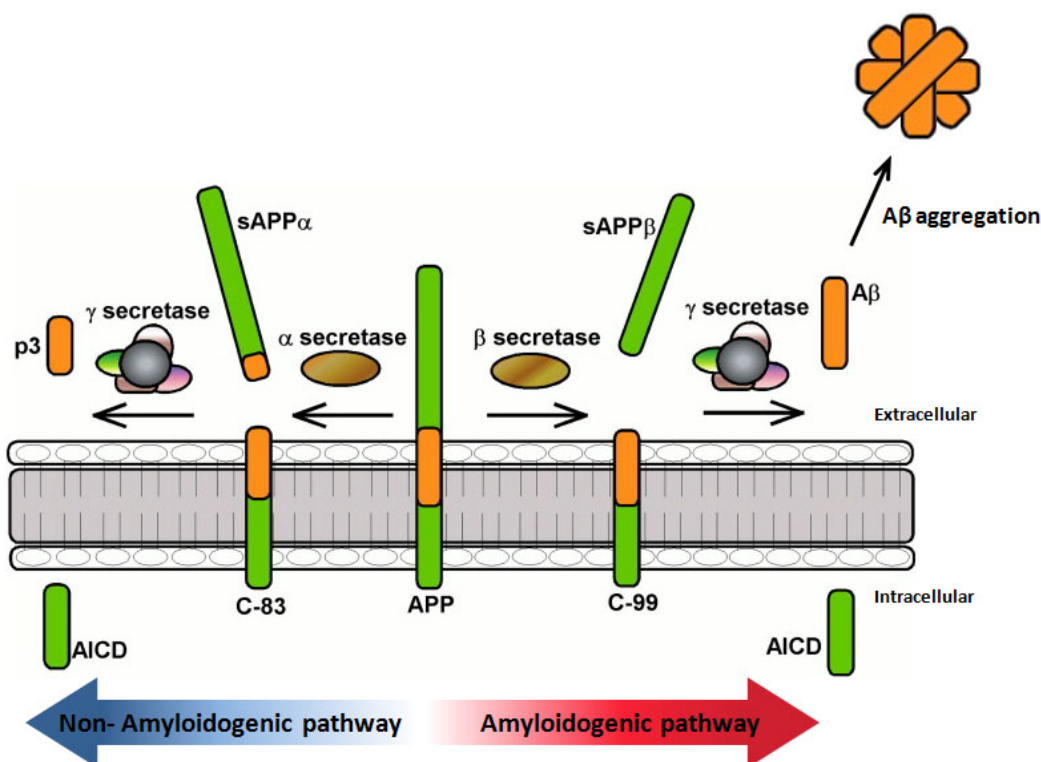


Figura 2. Esquema del processament proteolític de la proteïna APP (modificat de Boddapati et al., 2011).

La proteïna tau s'expressa principalment en les neurones i es troba predominantment en els axons, estabilitzant i promovent la polimerització dels microtúbuls, essencials pel transport axonal. Així, la fosforilació de tau comportarà la desestabilització dels microtúbuls i la seva agregació en els filaments aparellats helicoidals (*paired helical filaments o PHF*) formant-se els cabdells neurofibril·lars. Diferents proteïnes cinases fosforilen a tau en residus de serina i treonina, de les quals destaquen GSK-3β (*glycogen synthase kinase-3 beta*), CDK5 (*ciclin-dependent kinase 5*), CK1 (*casein kinase 1*), PKA (*cyclic AMP-dependent Protein kinase A*), p38 i JNK (*c-Jun amino-terminal kinase*) (Cho i Johnson, 2003; Hanger et al., 2009; Prvulovic i Hampel, 2011). Si ens centrem en GSK-3β, se sap que la seva activitat es troba regulada per fosforilació, inactivant-se quan és fosforilada en el residu de serina 9; en canvi, la fosforilació en tirosina 216 l'activa (Jope et al., 2007). L'estrès oxidatiu activa a GSK-3β (Lovell et al., 2004), i es considera l'augment de la seva activitat com un dels factors etiològics de la malaltia d'Alzheimer (Forlenza et al., 2012).

Es coneix que les agregacions proteiques típiques es comencen a formar en estadis preclínics, quan encara no s'han posat de manifest els símptomes de la malaltia, i que la hiperfosforilació i agregació de la proteïna tau amb la conseqüent desestabilització dels microtúbuls dels axons neuronals, comencen a formar-se abans que els depòsits de β -amiloide (Nelson et al., 2012). És important assenyalar que els agregats de proteïna tau no són específics de la malaltia d'Alzheimer, ja que també es poden trobar en persones grans no dementes. Però són la densitat i la localització cerebral els que determinen una persona amb demència o no. Així, es troben NFTs en l'hipocamp d'ambdues persones; però és la presència en el neocòrtex el que diferencia a un malalt d'Alzheimer i altres tautopaties d'un individu sa. Quant al β -amiloide, trobem plaques en malalts d'Alzheimer; en canvi, en persones grans no està del tot clara la seva presència. Recentment, Nelson et al. (2012) han establert que existeix realment una correlació entre la intensitat del dèficit cognitiu i el nombre dels depòsits de proteïna tau i β -amiloide a nivell del neocòrtex cerebral, el qual participa en l'elaboració de les funcions cerebrals més complexes com la memòria i el llenguatge. Però cal dir que, malgrat que la formació dels agregats proteics comencen a formar-se en estadis preclínics de la malaltia, la pèrdua de neurones en el còrtex entorrinal i la zona CA1 de l'hipocamp, conjuntament amb una pèrdua de les funcions cognitives, no té lloc fins a estadis primerencs de la malaltia. És quan es parla de MCI, i alguns autors es refereixen com a '*very mild Alzheimer disease*' (Price et al., 2001).

Estudis en ratolins transgènics de la malaltia destaquen el paper clau de l'estrès oxidatiu mitocondrial amb la generació tant del β -amiloide com en l'augment de la fosforilació de tau, donant lloc a la formació d'agregats junt amb la disfunció sinàptica; conduint finalment a la mort neuronal junt amb alteracions cognitives de l'aprenentatge i la memòria (Hoover et al., 2010; Knobloch i Mansuy, 2008; Manczak et al., 2006; Melov et al., 2007; Sydow et al., 2011).

3. Exercici físic

3.1 Definició i beneficis sobre la salut

L'exercici físic és una activitat física -entenent a aquesta com a qualsevol moviment corporal produït pels músculs esquelètics que resulta en una despesa energètica-,

que és planificada, estructurada i repetida, i que té com a finalitat la millora o el manteniment de la forma física i per extensió, de la salut. La realització d'exercici físic està associada amb nombrosos beneficis en les persones tant a nivell físic com psicològic. Així, tant la pràctica d'exercici físic com el canvi a un estil de vida suficientment més actiu, produeix entre d'altres, una disminució del risc de desenvolupar malaltia coronària, ictus, hipertensió, osteoporosi, diabetis de tipus II i alguns tipus de càncer com el de colon i pulmó (Garber et al., 2011; Gremeaux et al., 2012) (Veure Taula 1). A nivell cerebral, l'exercici físic prevé i millora trastorns depressius i d'ansietat, millora les funcions intel·lectuals, està associat a una disminució del risc de patir deteriorament cognitiu i demència (van Praag, 2009) i millora la rehabilitació cognitiva després d'un dany cerebral (Greal et al., 1999). Altres estudis estableixen que la pràctica d'exercici físic redueix la mortalitat en persones d'edat avançada (≥ 65 anys) (Middleton et al., 2008; Scarmeas et al., 2011).

Quina seria la duració, freqüència, intensitat i tipus d'exercici físic amb el qual ja obtenim aquests beneficis? Segons l'*American College of Sports Medicine* (Garber et al., 2011), per a promoure i mantenir la salut, les persones adultes (18-65 anys) necessiten: 30-60 minuts/dia (150 minuts/setmana), 5 o més dies a la setmana per exercici moderat (46-63% de la capacitat aeròbica màxima o màxim consum d'oxigen o també, VO_{2max}) o 20-60 minuts/dia (75 minuts/setmana), 3 o més dies a la setmana per exercici vigorós (64-90% de la VO_{2max}). També, una combinació d'ambdós, 3-5 o més dies a la setmana. Per a persones sedentàries, uns 20 minuts/dia, un total d'uns 150 minuts a la setmana, ja resultaria beneficiós. Aquestes pautes, fan referència a exercici aeròbic, com pot ser la natació, córrer o simplement caminar. Si ens centrem en el volum total de treball, aquest estaria al voltant de les 1000 kilocalories per setmana. Diferents autors assenyalen que fins i tot la meitat del valor d'aquesta despesa energètica seria suficient per disminuir el risc de patir malaltia cardiovascular o de mortalitat prematura. La relació dosi-resposta entre el volum d'exercici físic amb els resultats sobre la salut està ben establerta per diferents estudis. Així trobem la frase que diu: 'qualcom d'exercici és bo, més és millor' (Haskell et al., 2007). En canvi, el perfil de la corba dosi-resposta és menys clara, la qual depèn del paràmetre de salut mesurat i de l'activitat física realitzada per l'individu.

1	Millora la funció endotelial i l'estabilitat de les plaques ateroscleròtiques
2	Redueix la inflamació sistèmica
3	Efectes beneficiosos sobre la regulació autònoma de la funció cardiovascular
4	Millora en el control de diferents factors de risc cardiovascular: <ul style="list-style-type: none"> • Augmenta el colesterol HDL i disminueix el colesterol LDL i els triglicèrids • Redueix la pressió arterial • Redueix la massa grassa corporal • Redueix la resistència a la insulina i millora el metabolisme de la glucosa
5	Efectes antitrombòtics i antiagregants plaquetaris
6	Mecanismes a nivell cardíac <ul style="list-style-type: none"> • Redueix el dany miocàrdic durant un procés d'isquèmia perllongada • Prevé les arítmies ventriculars induïdes per reperfusió
7	Millora el màxim consum d'oxigen (VO_{2max}) <ul style="list-style-type: none"> • Redueix totes les causes de mortalitat junt amb la mortalitat cardiovascular • Millora la capacitat funcional, la qualitat de vida i la realització d'activitats de la vida diària • Millora la funció pulmonar • Millora l'hemodinàmica central (despesa cardíaca/volum sistòlic) • Millora el metabolisme del múscul esquelètic (flux sanguini, utilització d'O₂, funció mitocondrial)
8	Millora la funció del múscul esquelètic (l'entrenament de resistència) <ul style="list-style-type: none"> • Millora la massa muscular i la força desenvolupada pels diferents grups de músculs • Millora la força muscular (força generada a una velocitat de contracció alta) • Millora la qualitat muscular, el reclutament muscular i el teixit connectiu • Redueix els déficits funcionals i la comorbiditat • Millora la qualitat de vida i la realització d'activitats instrumentals de la vida diària
9	Millora la densitat mineral òssia i la seva ultraestructura
10	Millora la funció cromosòmica <ul style="list-style-type: none"> • Millora l'activitat enzimàtica de la telomerasa • Redueix l'escurçament dels telòmers
11	Millora la funció cognitiva (entrenament aeròbic i de resistència)

Taula 1. Efectes positius de l'exercici físic sobre el deteriorament fisiològic associat a l'envelliment (Gremeaux et al., 2012).

3.2 Estudis en humans i rosegadors

Com hem comentat anteriorment, l'exercici físic millora diferents aspectes relacionats amb la cognició en humans, encara que els mecanismes moleculars no estan del tot ben establerts (Um et al., 2011). Així, estudis en joves (22 ± 2 anys) on s'avaluava aspectes com l'aprenentatge i la memòria confirmen aquesta millora (Griffin et al., 2011; Winter et al., 2007). A més, Middleton et al. (2010) estableixen que la realització d'exercici físic de manera constant des que un és jove, fa més resistent el cervell al

deteriorament en edats més avançades, el que es coneix com a reserva cognitiva (Nithianantharajah i Hannan, 2009). La pràctica d'exercici físic en adults i en persones d'edat avançada, també millora el deteriorament cognitiu associat a l'envelliment (Nemati Karimooy et al., 2012; Smith et al., 2010) i a malalties neurodegeneratives (Kemoun et al., 2010; Venturelli et al., 2011). En canvi, altres autors (Eggermont et al., 2009; Scarmeas et al., 2011) estableixen que en pacients amb demència o diagnosticats de malaltia d'Alzheimer, la pràctica d'exercici físic o l'augment de l'activitat física, no millora el deteriorament cognitiu. Això pot ser degut a un règim d'exercici molt suau, a la curta durada del programa d'exercici o a la presència de malaltia cardiovascular concomitant en quasi un 90% dels pacients (Eggermont et al., 2009). D'altra banda, es coneix que l'exercici físic disminueix el risc de patir demència i altres trastorns cognitius (Ahlskog et al., 2011; Geda et al., 2010).

Per tant, una pràctica d'exercici i activitat física reduïda i un estil de vida sedentari serien considerats uns factors de risc en el desenvolupament de malalties neurodegeneratives com la malaltia d'Alzheimer.

En rosegadors, també es confirmen els resultats quant als efectes de l'exercici físic determinats en humans. Així, la pràctica d'exercici físic millora els resultats de diferents tests que avaluen la capacitat d'aprenentatge i la memòria, -on està implicat l'hipocamp i el còrtex cerebral-, com pot ser el laberint d'aigua, el test de reconeixement d'objectes (O'Callaghan et al., 2007, 2009) i una variant d'aquest (Griffin et al., 2009). En models de ratolins transgènics de la malaltia d'Alzheimer també s'han establert aquests efectes positius de l'exercici (García-Mesa et al., 2012, 2011; Ke et al., 2011; Yuede et al., 2009).

Diferents estudis tant en humans com en rosegadors, estableixen que l'exercici físic, a més de totes aquestes accions positives a nivell cerebral, pot produir tot un conjunt d'efectes beneficiosos a nivell cardiovascular (Golbidi i Laher, 2011), en el múscul esquelètic (Little et al., 2010; Pasini et al., 2012) i en altres òrgans i sistemes (Gremeaux et al., 2012; Rector et al., 2011). A continuació es parlarà d'alguns dels mecanismes moleculars i processos que s'han relacionat amb els efectes beneficiosos de l'exercici físic, primer a nivell cerebral i posteriorment a nivell perifèric.

3.3 Mecanismes moleculars implicats en els efectes de l'exercici físic a nivell cerebral

Dintre dels mecanismes moleculars relacionats amb els efectes beneficiosos i que són modulats per l'exercici físic a nivell cerebral, concretament a nivell de l'hipocamp i el còrtex cerebral, hi trobem: el procés de neurogènesi, la plasticitat sinàptica, l'angiogènesi, diferents sistemes de neurotransmissors i factors de creixement, la biogènesi mitocondrial, els enzims antioxidants i la millora de la carga de proteïna β -amiloide i tau fosforilada. De tots ells es parlarà a continuació amb més detall.

El procés de **neurogènesi** està relacionat amb la capacitat d'aprenentatge i memòria. Aquest procés de formació de noves neurones es troba regulat tant per factors intrínsecs, com els neurotransmissors, hormones, factors de creixement i l'activitat neuronal, com per factors extrínsecs, com són l'enriquiment ambiental, l'estrès, la restricció calòrica, l'exercici físic (Lazarov et al., 2010; Verret et al., 2007) i l'ús de compostos com la melatonina (Ramírez-Rodríguez et al., 2012). El cervell adult dels mamífers produeix noves neurones en dues zones del cervell: la zona subventricular i el gir dentat (GD) de l'hipocamp, sent aquest últim una àrea cerebral que està implicada en el procés d'aprenentatge i memòria, el qual resulta deteriorat durant l'envelliment (Lazarov et al., 2010). Es coneix que el procés de neurogènesi disminueix amb l'envelliment (Kronenberg et al., 2006; Miranda et al. 2012), sent l'exercici físic un important estímul neurogènic a nivell de l'hipocamp, millorant així la capacitat d'aprenentatge i memòria (van Praag, 2008). Estudis en rosegadors confirmen aquest fet en el GD juntament amb una millora dels resultats en el laberint d'aigua (Clark et al., 2009; Mustroph et al., 2012). A més, la disminució de la neurogènesi amb l'edat es pot atenuar amb l'exercici tant en rosegadors joves (Clark et al., 2009), adults (Wu et al., 2008) i fins i tot en vells (van Praag et al., 2005).

La **plasticitat sinàptica**, entenent aquesta com els canvis que es produeixen a nivell estructural i funcional de la sinapsi entre les neurones, també participa en el procés d'aprenentatge i memòria. La potenciació a llarg termini (*long-term potentiation* o LTP), és una intensificació de la comunicació sinàptica entre dues neurones, la qual és una mesura del procés de plasticitat sinàptica (van Praag, 2008). Estudis en rosegadors, sotmesos a exercici voluntari (Farmer et al., 2004) i forçat (O'Callaghan et al., 2007), van

mostrar un augment d'LTP en el GD, i uns millors resultats en el test de reconeixement d'objectes. En aquest procés d'LTP en el GD jugaria un paper important les subunitats NR2A i NR2B dels receptors per a NMDA (N-metil-D-aspartat) (Ge et al., 2007; Vasuta et al., 2007). D'altra banda, si ens fixem amb més detall, també s'han observat canvis morfològics neuronals amb l'exercici. Es coneix que a l'igual que succeeix en les persones grans, l'habilitat per aprendre noves tasques disminueix amb l'edat en rosegadors (van Praag, 2009). Així, durant l'envelliment i en malalties neurodegeneratives com la malaltia d'Alzheimer, es produeix a nivell de l'hipocamp i del còrtex cerebral, una pèrdua de sinapsis i d'espines dendrítiques (protuberàncies de les dendrites que contenen sinapsis excitatòries), juntament amb una davallada dels nivells de proteïnes que participen en la sinapsi (Bishop et al., 2010; Esiri, 2007; Reddy et al., 2005; Shimada et al., 2003). L'exercici físic augmenta la densitat de les espines dendrítiques tant a nivell de l'hipocamp com en el còrtex entorrinal, a més d'incrementar la ramificació de les dendrites (Stranahan et al., 2007). Així, canvis en el mida i la quantitat d'espines està associat amb la inducció d'LTP (van Praag, 2009). En l'hipocamp, l'exercici incrementa els nivells de proteïnes implicades en la transmissió sinàptica, com són la sinaptofisina i la sinapsina I, en què estaria implicat el BDNF (Vaynman et al., 2006), del qual en parlarem més endavant.

Per tant, l'exercici, al modificar diferents aspectes relacionats amb la plasticitat sinàptica, podria estar contribuint a la millora del procés d'aprenentatge i memòria.

L'**angiogènesi** és la formació de nous vasos sanguinis a partir dels ja existents. El factor de creixement insulínic de tipus 1 (*insulin-like growth factor 1* o IGF-1) i el factor de creixement de l'endoteli vascular (*vascular endothelial growth factor* o VEGF) regulen aquest procés, i també la neurogènesi a nivell cerebral, sent l'exercici capaç de modular ambdós factors (van Praag, 2009).

Si ens centrem en els efectes angiogènics, s'ha determinat que l'exercici en rates velles (22 mesos) produeix a nivell cerebral un augment dels nivells d'mRNA i proteics de VEGF, fet que es correlaciona amb un augment de la microvasculatura (Ding et al., 2006b). Aquest increment de l'angiogènesi també s'ha establert en ratolins joves (8 setmanes) (Van der Borght et al., 2009). Cal remarcar que aquesta estimulació de l'angiogènesi s'acompanya per l'increment de la neurogènesi; i que tot plegat contribuiria a una millora cognitiva (Clark et al., 2009). L'exercici físic augmenta també els nivells proteics d'IGF-1 tant a nivell cerebral (Carro et al., 2000) com en sèrum (Llorens-Martín et

al., 2010). A més, afavoreix el pas d'IGF-1 des de la perifèria al cervell (Trejo et al., 2001), incrementant la vascularització cerebral (Lopez-Lopez et al., 2004). D'altra banda se sap que l'IGF-1 controla l'expressió de VEGF mitjançant el factor HIF-1 (*hypoxia-inducible factor-1*), el qual és activat amb l'exercici (Lopez-Lopez et al., 2004).

Tenint en compte que alteracions en la vasculatura podrien estar implicades en el desenvolupament de malalties neurodegeneratives (Lopez-Lopez et al., 2004), es considera que un augment de la vascularització a nivell cerebral, -la qual és regulada per l'exercici-, seria un mecanisme neuroprotector ja que asseguraria un subministrament adequat de nutrients i oxigen a les neurones.

Dintre dels **sistemes de neurotransmissors** que són modificats a nivell cerebral per l'exercici trobem el sistema glutamatèrgic, endocannabinoide, GABAèrgic i monoaminèrgic (serotonina) (Vivar et al., 2012) (Taula 2).

Sistema de neurotransmissors	Efectes exercici físic a nivell cerebral	Referències
Glutamatèrgic	Modulació receptor NMDA i AMPA: ↑ plasticitat sinàptica	Farmer et al., 2004 Ge et al., 2007 Real et al., 2010 Vasuta et al., 2007
Endocannabinoide	↑ endocannabinoïdes en plasma; modulació receptor CB ₁ : ↑ neurogènesi i possibles efectes antidepressius	Gorzalka i Hill, 2011 Heyman et al., 2012 Hill et al., 2010b
GABAèrgic	Resultats dispers en l'↑/↓ de l'expressió gènica	Hill et al., 2010a Molteni et al., 2002
Monoaminèrgic: serotonina (o 5-HT)	↑ triptòfan (precursor 5-HT), ↑ triptòfan hidroxilasa (enzim limitant de la síntesi de 5-HT): ↑ neurogènesi i efectes antidepressius	Brené et al., 2007 Ernst et al., 2006 Marlatt et al., 2010

Taula 2. Sistemes de neurotransmissors modulats per l'exercici físic a nivell cerebral.

Els **factors neurotròfics** estan implicats en el manteniment de l'activitat neuronal, el procés de plasticitat i la neurogènesi, entre els quals hi trobem: el factor neurotròfic derivat del cervell (*brain-derived neurotrophic factor* o BDNF), el factor de creixement neuronal (*nerve growth factor* o NGF), el VEGF i l'IGF-1.

El BDNF és considerat el principal factor que augmenta amb l'exercici (Vivar et al., 2012). En estudis tant en joves (Zoladz et al., 2008) com en persones d'edat avançada (Coelho et al., 2013), l'exercici va augmentar els nivells en plasma de BDNF. En rates joves, l'exercici no va modificar els seus nivells en el GD (Titterness et al., 2011). En canvi, en ratolins adults, l'exercici tant voluntari (Marlatt et al., 2012) com forçat (Wu et al., 2008), si que va produir un increment dels nivells de BDNF, junt amb un augment de la neurogènesi en el GD i d'uns millors resultats en el laberint d'aigua. Aquest factor neurotròfic participa en els processos de plasticitat sinàptica a nivell de l'hipocamp, en què estaria implicat la fosforilació de la subunitat 2B del receptor d'NMDA (NR2B) (Waterhouse i Xu, 2009). Recentment, Burnouf et al. (2013) han observat una disfunció sinàptica per la interacció de la proteïna tau amb l'NR2B juntament amb una disminució de la resposta per BDNF, i conseqüentment, uns pitjors resultats en el laberint d'aigua.

NGF està implicat en la neurogènesi en l'adult. Així, l'exercici físic en rates adultes va augmentar els nivells d'NGF i la neurogènesi en el GD (Chae et al., 2012).

Quant a VEGF, Fabel et al. (2003) destaquen el paper clau del VEGF en el procés de neurogènesi, ja que al blocar la seva entrada a nivell cerebral, s'inhibeix la neurogènesi induïda per l'exercici. Atès que l'exercici físic augmenta el flux sanguini i la neurogènesi a nivell del GD en ratolins, i en humans incrementa també el flux sanguini en el GD juntament amb l'obtenció de millors resultats en diferents test cognitius; s'ha proposat que en humans, l'augment del flux sanguini podria ser una mesura indirecta del procés de neurogènesi (Pereira et al., 2007).

A l'igual que el VEGF, IGF-1 és capaç de travessar la barrera hematoencefàlica, observant-se una reducció de la neurogènesi al bloquejar la seva entrada a nivell cerebral (Trejo et al., 2001). IGF-1 té com a diana BDNF, i per tant, si es bloqueja el receptor d'IGF-1, disminueixen els nivells de BDNF en l'hipocamp, obtenint-se pitjors resultats en el laberint d'aigua (Ding et al., 2006a). Estudis en humans han establert un descens dels nivells tant de BDNF (Tapia-Arancibia et al., 2008) com d'IGF (Aleman i Torres-Alemán, 2009) en el plasma de persones grans i en el cervell de malalts d'Alzheimer. Aquests fets, juntament amb el descens de la densitat capil·lar a nivell cerebral observat amb l'edat (Ambrose, 2012), estarien relacionats amb el deteriorament intel·lectual associat a l'envelliment i a malalties neurodegeneratives.

Cal recordar que la mitocondria esdevé clau en el manteniment de la supervivència cel·lular, i que la seva alteració funcional està relacionada amb l'envelliment i el desenvolupament de malalties neurodegeneratives (Beal, 2005; Boveris i Navarro, 2008a; Lin i Beal, 2006). Pocs són els estudis que es centren en els efectes de l'exercici físic sobre la **biogènesi mitocondrial** a nivell cerebral. Així, Zhang et al. (2012) van determinar en rates que havien fet exercici un augment de l'expressió dels factors de transcripció mitocondrials, PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) i NRF-1 (*nuclear respiratory factor 1*). Aquest fet es va correlacionar amb un increment dels nivells proteics de l'enzim de la cadena respiratòria citocrom c oxidasa (subunitat IV), el qual es considera un marcador de carga mitocondrial. Steiner et al. (2011) van obtenir resultats semblants en ratolins, observant un increment de l'expressió de PGC-1 α i sirtüna 1, -ambdós relacionats amb la biogènesi mitocondrial-, a més dels nivells de DNA mitocondrial. D'altra banda, l'exercici reverteix el descens d'activitat amb l'edat dels complexos I i IV de la cadena respiratòria (Navarro et al., 2004).

La disfunció mitocondrial produeix un augment de l'estrès oxidatiu, i conseqüentment, incrementa el dany oxidatiu de lípids, proteïnes i DNA (Liu et al., 2009a; Radak et al., 2011). Així, el descens de l'activitat dels enzims de la cadena respiratòria mitocondrial a nivell cerebral es correlaciona amb un augment d'aquest dany oxidatiu (Navarro i Boveris, 2007). En aquest i altres estudis com el de Navarro et al. (2004), l'exercici va reduir el dany oxidatiu de lípids i proteïnes associat a l'envelliment, a més d'augmentar l'activitat d'alguns dels **enzims antioxidants** com la SOD (Mn i Cu,Zn-SOD) i la CAT. PGC-1 α regula l'expressió d'enzims antioxidants (St-Pierre et al., 2006). Així, s'ha establert un augment dels nivells proteics de PGC-1 α amb l'exercici de llarg termini juntament amb els nivells de SOD i GPx, observant-se una disminució dels nivells de ROS i de proteïnes carbonilades (Marosi et al., 2012).

Si ens centrem en els efectes de l'exercici sobre els agregats proteics observats en l'envelliment i la malaltia d'Alzheimer, diferents estudis en ratolins transgènics van mostrar que l'exercici disminueix els nivells de la proteïna **tau fosforilada** (Leem et al., 2009), i també les plaques de **β -amiloide** (Adlard et al., 2005; Yuede et al., 2009), obtenint-se millors resultats en el laberint d'aigua. Altres autors no van observar una reducció de les plaques amb l'exercici, però sí una disminució dels nivells dels pèptids

A β_{40} i A β_{42} (Ke et al., 2011). Parachikova et al. (2008), no van mostrar canvis ni en les plaques ni en els nivells de pèptid A β , possiblement degut a l'edat avançada dels ratolins i a la curta durada del protocol d'exercici utilitzat (3 setmanes) enfront dels 5 i 4 mesos utilitzats per Adlard et al. (2005) i Yuede et al. (2009) respectivament.

Molts d'aquests efectes beneficiosos de l'exercici físic a nivell cerebral es mostren en estudis tant en humans com en rosegadors on es van administrar compostos polifenòlics, concretament els flavonoides i el resveratrol. Aquests components, els quals provenen de plantes i fruites, són capaços de millorar aspectes cognitius com la memòria i l'aprenentatge (Spencer, 2008). Un bon exemple de tot això és la reducció tant dels agregats i els nivells de proteïna tau fosforilada com de les plaques de β -amiloide amb l'administració d'una dieta rica en polifenols en ratolins transgènics de la malaltia d'Alzheimer, juntament amb una millora dels resultats en el laberint d'aigua (Fernández-Fernández et al., 2012; Wang et al., 2010). Per tant, els polifenols procedents de la dieta, com els flavonoides i el resveratrol, junt amb la pràctica d'exercici físic podrien actuar sinèrgicament en els efectes neuroprotectors establerts. Així doncs, podem considerar ambdós com una bona estratègia terapèutica no farmacològica per prevenir o retardar l'aparició i també per millorar el deteriorament cognitiu associat a l'envelliment i a les malalties neurodegeneratives (Ahlskog et al., 2011; Angevaren et al., 2008; Radak et al., 2010; Spencer, 2008; van Praag, 2009) (Figura 3).

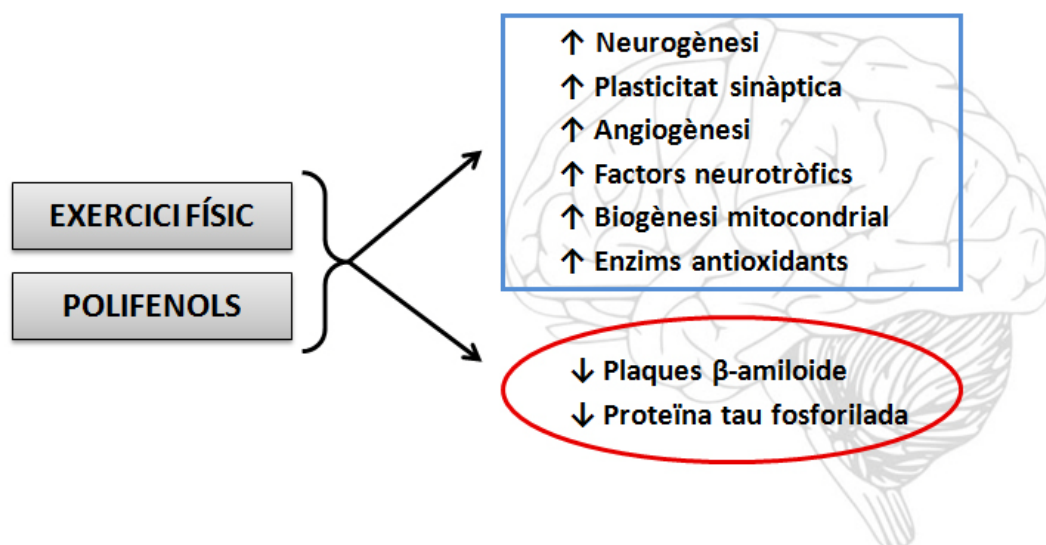


Figura 3. Efectes neuroprotectors de l'exercici físic i dels compostos polifenòlics.

3.4 Mecanismes moleculars implicats en els efectes de l'exercici físic a nivell perifèric

Estudis en humans i en rosegadors estableixen els efectes beneficiosos de l'exercici físic a nivell perifèric. Concretament, ens centrarem en els efectes sobre el múscul esquelètic, el fetge i el cor, per ser aquests els teixits estudiats en aquesta tesi doctoral.

Es coneix que l'exercici físic augmenta els nivells de ROS a nivell sistèmic. En canvi, la pràctica d'exercici està relacionada amb una disminució de la incidència de malalties associades a l'estrès oxidatiu, com poden ser les malalties cardiovasculars, alguns tipus de càncer i les malalties neurodegeneratives. Aquest fenomen vindria donat per una adaptació de l'organisme a l'exercici, el qual s'explicaria pel mecanisme de l'hormesi (Radak et al., 2008a). Aquest es defineix com la resposta adaptativa de l'organisme davant l'exposició a dosis baixes d'un agent "nociu" o agent estressant, el qual finalment indueix una millora de les funcions fisiològiques de l'organisme (Calabrese i Baldwin, 2002). Així, enfront del trencament de l'homeòstasi, l'organisme respon amb una resposta de sobrecompensació. En un principi, l'exercici (agent estressant) produiria un increment de ROS, el qual resultaria en una resposta adaptativa de l'organisme caracteritzada per: un increment de l'activació dels sistemes antioxidants i dels mecanismes de reparació i eliminació del dany oxidatiu, un increment de la resistència a l'estrès oxidatiu, un menor dany oxidatiu i uns nivells basals baixos de ROS (Radak et al., 2008a, 2008b).

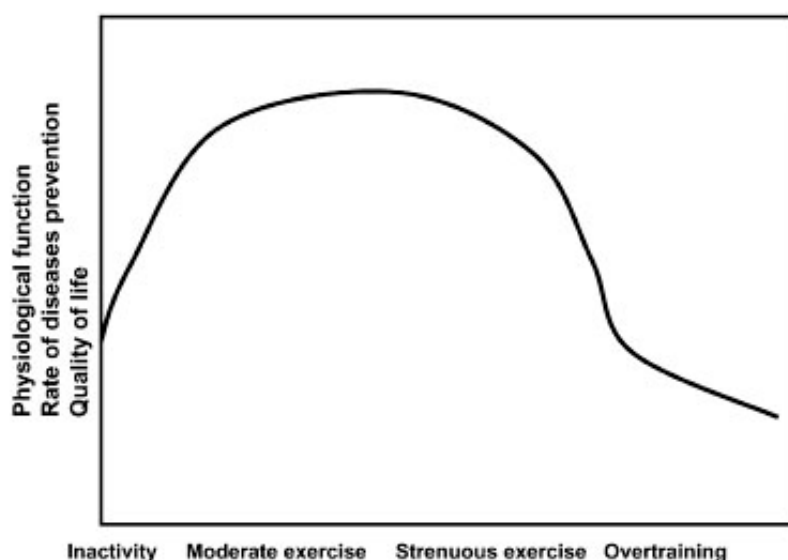


Figura 4. Típica corba d'hormesi i els efectes de l'exercici (Radak et al., 2008b).

Per tant, es pensa que l'envelliment saludable es pot aconseguir pel mecanisme d'hormesi, en què la pràctica d'exercici físic moderat milloraria les funcions fisiològiques de diferents òrgans, previndria de patir certes malalties i milloraria la qualitat de vida. En canvi, la inactivitat física, però també l'exercici físic intens i el sobreentrenament, produirien un deteriorament de les funcions fisiològiques, una alteració dels processos hormonals, una depressió del sistema immune i augmentarien el risc d'emmalaltir (Radak et al., 2008b; Rattan, 2008) (Figura 4).

Referent als efectes de l'exercici físic a nivell del **múscul esquelètic** ens centrarem en aspectes com el dany oxidatiu, els enzims antioxidants, la sarcopènia, la biogènesi mitocondrial i el procés d'angiogènesi.

Estudis en humans (Mecocci et al., 1999) i en rosegadors (Cakatay et al., 2003) estableixen en múscul esquelètic un augment del dany oxidatiu de proteïnes, lípids i DNA amb l'edat, on la pràctica d'exercici físic pot revertir aquest dany (Lambertucci et al., 2007; Pinho et al., 2006; Radák et al., 2002; Wohlgemuth et al., 2010).

Quant als enzims antioxidants, l'exercici físic produeix diferents efectes pel que fa a la seva expressió, nivells proteics i activitat que varia en funció de l'enzim considerat (Boveris i Navarro, 2008b; Ji, 2008; Lambertucci et al., 2007; Pinho et al., 2006).

Una altra característica lligada a l'envelliment és la sarcopènia o pèrdua de massa muscular juntament amb una pèrdua de força, sent l'exercici físic una bona pràctica per millorar ambdues (Gremeaux et al., 2012; Peterson i Gordon, 2011).

L'exercici físic també produeix un augment de la biogènesi mitocondrial en el múscul esquelètic, on estaria implicat l'increment de l'expressió de gens mitocondrials per PGC-1 α (Olesen et al., 2010). Cal remarcar el paper important de l'eix PGC-1 α -AMPK-SIRT1, del qual en parlarem més endavant. Així, en persones joves (21 anys), la pràctica d'exercici augmentà en nucli els nivells proteics de PGC-1 α . Aquest fet es va correlacionar amb un augment tant dels nivells proteics com de l'activitat de l'enzim de la cadena respiratòria citocrom c oxidasa (subunitats II i IV), i del metabolisme, la citrat sintasa (CS), alhora que es va obtenir un millor rendiment esportiu (Little et al., 2010). Resultats semblants van determinar Bori et al. (2012), tant en persones joves com en persones grans (majors de 60 anys). Una dada interessant que es va observar en aquest estudi és que les persones joves tenien una activació de la biogènesi mitocondrial en resposta a l'exercici superior a les grans. Estudis en rosegadors joves i adults mostren com l'exercici augmenta

els nivells proteics de PGC-1 α i citocrom c oxidasa (Pasini et al., 2012; Suwa et al., 2008) i també els d'AMPK fosforilada (Reznick et al., 2007).

La disminució de la capil·larització amb l'edat és atenuada per la pràctica d'exercici, sent els nivells proteics de VEGF més alts en resposta a l'exercici en joves que en adults (Gavin et al., 2007). D'altra banda, en individus amb hipertensió arterial, els quals presenten una reducció de VEGF, l'exercici físic va incrementar els nivells proteics d'aquest i també la capil·larització, juntament amb un descens de la pressió arterial (Hansen et al., 2010). Estudis en ratolins mostren com l'exercici augmenta tant l'expressió com els nivells proteics de VEGF, en què estaria implicat PGC-1 α , ja que en ratolins *knockout* de PGC-1 α no es van establir aquests canvis (Leick et al., 2009).

Alguns dels efectes beneficiosos de l'exercici físic sobre el múscul esquelètic, també tenen lloc a nivell del **fetge**. A continuació parlarem d'aspectes com el dany oxidatiu, els enzims antioxidants, els enzims de la cadena respiratòria mitocondrial, els processos inflamatoris i el contingut lipídic.

Estudis com el de Navarro et al. (2004) van sotmetre a ratolins mascles i femelles (28 setmanes a l'inici de l'experiment) a exercici físic fins les 78 setmanes de vida. L'augment amb l'edat en el fetge del dany oxidatiu tant de lípids (TBARS) com de proteïnes (carbonilació de proteïnes), -sent aquest dany més intens en mascles-, va ser reduït en ambdós sexes amb l'exercici. L'activitat de diferents complexos de la cadena respiratòria (Complexos I-III i IV) disminueix amb l'edat, més pronunciadament en mascles, on l'exercici reverteix aquest descens. A més, es va establir una correlació negativa entre el dany oxidatiu de proteïnes i l'activitat del citocrom c oxidasa (o Complex IV). Quant als enzims antioxidants SOD (Mn i Cu,Zn-SOD) i CAT, l'exercici, -principalment en femelles-, va revertir el descens de la seva activitat observat amb l'edat. Així, en fetge, l'increment amb l'edat de la producció de ROS juntament amb un descens de l'activitat dels enzims antioxidants, conduiran a un augment del dany oxidatiu de proteïnes i lípids junt amb la disfunció mitocondrial. L'exercici físic és capaç de revertir aquest deteriorament, contribuint així a l'augment de la supervivència observada en els animals d'aquest estudi.

En l'estudi dut a terme per Radák et al. (2004) en rates adultes (18 mesos) i velles (28 mesos), l'exercici (8 setmanes) va reduir l'increment amb l'edat dels nivells de ROS i el dany oxidatiu de lípids. A més, l'exercici augmentà els nivells de glutatió reduït, la

reducció dels quals s'associa amb l'estrès oxidatiu. Referent al factor nuclear NF- κ B (*nuclear factor- κ B*), aquest es considera el principal regulador de la resposta inflamatòria i immunitària. És un factor de transcripció sensible a l'estrès oxidatiu, el qual s'activa translocant del citoplasma al nucli on regula l'expressió de gens relacionats amb la inflamació i l'apoptosi entre d'altres (Caballero i Coto-Montes, 2012). Així, amb l'edat, s'observa en fetge un augment tant dels nivells nuclears d'NF- κ B com de la seva unió al DNA, sent l'exercici capaç de reduir ambdós paràmetres (Radák et al., 2004).

Per tant, l'exercici, a més de reduir tant l'augment de ROS com el dany oxidatiu que té lloc en l'envelliment, disminuiria l'activació d'NF- κ B, i per tant, la incidència de malalties inflamatòries associades a l'envelliment.

Per últim, estudis en humans (Johnson et al., 2009, 2012) i en rosegadors (Kawanishi et al., 2012) indiquen una reducció del contingut lipídic hepàtic amb la pràctica d'exercici, fet que resultaria beneficiós en malalties com l'esteatosi hepàtica no alcohòlica.

Pel que fa als efectes de l'exercici físic sobre el **cor**, ens centrarem en el dany oxidatiu, els enzims antioxidants, els enzims de la cadena respiratòria mitocondrial i el procés d'angiogènesi.

Si tenim en compte l'estudi comentat anteriorment en fetge de Navarro et al. (2004), l'exercici en cor també va revertir l'augment del dany oxidatiu i el descens d'activitat dels Complexos I-III i IV produït per l'edat en ambdós sexes. De nou es va establir una correlació negativa entre el dany oxidatiu de proteïnes i l'activitat del citocrom c oxidasa. En aquest cas, l'exercici no va revertir a nivell cardíac el descens d'activitat per l'edat dels enzims Mn i Cu,Zn-SOD, i CAT (excepte Cu,Zn-SOD en mascles). També Ferrara et al. (2008) van determinar en rates velles com 8 setmanes d'exercici físic eren suficients per revertir el dany oxidatiu de lípids (TBARS i 4-HNE), a més d'augmentar els nivells proteics dels enzims Mn-SOD i CAT. Altres estudis mostren resultats oposats pel que fa al descens del dany oxidatiu i l'augment de l'activitat dels enzims antioxidants amb l'exercici (Golbidi i Laher, 2011; Gündüz et al., 2004).

Un altre efecte a destacar de l'exercici físic a nivell cardíac és el relacionat amb el procés d'angiogènesi. Així, estudis en adults sans (Laufs et al., 2005), i en persones amb risc cardiovascular i pacients de malaltia coronària (Steiner et al., 2005), mostren com l'exercici augmenta els nivells en plasma de VEGF i de les cèl·lules progenitores endotelials, precursors del procés d'angiogènesi. D'altra banda, la pèrdua de

vascularització a nivell cardíac amb l'edat junt amb el descens de l'expressió i els nivells proteics de VEGF és revertit amb 8 setmanes de natació en rates velles (Iemitsu et al., 2006).

Per tant, podem considerar la pràctica d'exercici físic com una bona pauta a seguir pel manteniment de la salut, ja que és capaç de millorar el deteriorament fisiològic de diferents òrgans i sistemes, tant l'associat a l'envelliment com a diferents malalties.

3.5 Exercici voluntari vs forçat: efectes a nivell cerebral

Com hem comentat anteriorment, la pràctica d'exercici físic moderat és millor que l'exercici intens i el sobreentrenament ja que produeix una millora tant a nivell del sistema immunitari i cardiovascular com a nivell cerebral (Radak et al., 2008b). Però el que diferents autors estan interessats en saber és si aquests beneficis cognitius tenen lloc tant si se sotmet a l'animal a exercici voluntari, on l'animal té lliure accés a una roda giratòria (parlem de *wheel running*), com forçat, fent córrer de manera 'obligada' a l'animal (*treadmill running*). A continuació, mostraré els resultats de diferents estudis on es van avaluar ambdós protocols d'exercici en un mateix experiment.

Leasure i Jones (2008) van estudiar en rates joves (7-8 setmanes) els efectes de l'exercici físic de 8 setmanes de duració. En aquest treball es va controlar que ambdós grups (exercici forçat i voluntari) corregueren la mateixa distància. Així, en els resultats del laberint d'aigua no es van observar diferències, però en el test de camp obert, -el qual s'utilitza per avaluar l'activitat locomotora i l'ansietat en rosegadors-, el grup d'exercici forçat va mostrar un major nivell d'ansietat. Si ens centrem en els resultats a nivell de la neurogènesi, el grup de rates sotmeses a exercici forçat tenia un major nombre de cèl·lules progenitores a nivell del GD, i per tant, major probabilitat de formació de noves neurones. Aquestes diferències poden ser degudes a la manera en què van córrer, és a dir, a la velocitat i el temps emprat. Ambdós grups van córrer distàncies semblants, però el grup d'exercici voluntari ho va fer més de pressa, i per tant en menys temps que el grup de forçat. Els autors d'aquest estudi i altres (Ang et al., 2006; O'Callaghan et al., 2007) proposen que l'exercici forçat s'assemblaria més al tipus d'exercici que fan habitualment les persones en el gimnàs, les quals estan 'sotmeses' a fer exercici un temps determinant damunt la cinta de córrer. Mentre que l'exercici voluntari s'assemblaria més al que fan els

corredors/es altament motivats, que van a entrenar freqüentment, com els atletes que fan atletisme de resistència. D'altra banda, Liu et al. (2009c) van fer un estudi amb ratolins de 3 mesos sotmesos durant 4 setmanes a exercici voluntari i forçat i no van veure diferències entre ambdós grups, ni en la millora dels resultats en el laberint d'aigua ni en els nivells de BDNF en l'hipocamp. Un altre estudi interessant és el de Yuede et al. (2009), on es va sotmetre a ratolins transgènics, -utilitzats com a model de malaltia d'Alzheimer-, de 5 mesos d'edat a fer exercici (forçat i voluntari) durant 16 setmanes. Els resultats van mostrar en aquest cas que el grup d'exercici voluntari obtenia millors resultats en el test de reconeixement d'objectes, i a més, tenia un menor nombre de plaques de β -amiloide.

En el punt anterior (apartat 3.3) on es parlava dels mecanismes moleculars implicats en els efectes de l'exercici físic a nivell cerebral, els diferents estudis que es feia referència en rosegadors, sol van aplicar un tipus de protocol d'exercici. Aquests mostren que l'exercici físic, tant voluntari com forçat, a diferents edats, és capaç d'estimular el procés de neurogènesi a nivell de l'hipocamp i també de millorar els resultats de diferents tasques on s'avaluava la capacitat d'aprenentatge i memòria. Per tant, quan estudiem els efectes de l'exercici físic a nivell cerebral, més que considerar un tipus o altre de protocol d'exercici, s'hauria de tenir en compte altres aspectes com l'edat, el sexe i la soca de ratolí/rata emprada, a més de la durada i la intensitat del protocol d'exercici.

Nombrosos investigadors (Lazarov et al., 2010; van Praag, 2009) defenen que els beneficis cognitius que exerceix l'exercici físic a nivell cerebral vindrien originats en part per l'estimulació del procés de neurogènesi a nivell de l'hipocamp. En canvi, hi ha d'altres que no veuen tan clar si existeix una relació causa-efecte entre exercici-neurogènesi-millora cognitiva, o simplement és una correlació vista en els diferents estudis fets fins ara (Lista i Sorrentino, 2010). A més, aspectes com la motivació (Klaus i Amrein, 2012) o l'estrès produït al sotmetre a l'animal a fer exercici (Ang i Gomez-Pinilla, 2007), també actuarien com a moduladors del procés de neurogènesi i millora cognitiva. Així, Lista i Sorrentino (2010) estableixen que els beneficis que es deriven de la pràctica d'exercici físic vindrien originats per l'estimulació i interacció conjunta a diferents nivells: entre diferents sistemes, ja sigui a nivell del sistema nerviós, cardiovascular i endocrí; a nivell cel·lular i molecular, i també entre diferents molècules. Així, aquests autors qüestionen si els beneficis de l'exercici físic tenen lloc per accions directes a nivell cerebral, o si són per la capacitat que té l'exercici físic de reduir patologies com la malaltia cardiovascular, la hipertensió o malalties metabòliques com la diabetis. I si ens centrem a nivell molecular,

caldria preguntar-se si els factors neurotròfics (BDNF, NGF, IGF-1, VEGF) que exerceixen bona part dels efectes positius a nivell cerebral, són específicament modulats per la pràctica d'exercici físic, o és un mecanisme molecular que comparteix l'exercici amb altres estímuls ambientals. I és aquí on estímuls com l'enriquiment ambiental, entenent a aquest com una modificació de l'hàbitat dels animals amb l'objectiu de millorar les seves condicions vitals, estimular el seu comportament exploratori i fomentar la seva interacció social; o també, la simple manipulació dels animals, poden arribar a produir efectes semblants als generats per l'exercici (Kumar et al., 2012; O'Callaghan et al., 2009), com pot ser la modulació de la plasticitat sinàptica/cerebral (Mora et al., 2007).

4. Vies moleculars implicades en el procés d'envelliment

4.1 Sirtuïnes

Inicialment identificades en el llevat *Saccharomyces cerevisiae*, les sirtuïnes (anomenades com a *silent information regulator* o SIRs) van ser agrupades com a histones desacetilases de classe III.

	Activitat enzimàtica	Localització	Procés patològic implicat
SIRT1	Desacetilasa	Nucli i citoplasma	Metabolisme, càncer, inflamació, sistema nerviós, cardiovascular i renal
SIRT2	Desacetilasa	Citoplasma	Metabolisme, càncer, sistema nerviós
SIRT3	Desacetilasa	Mitocòndria	Metabolisme i sistema cardiovascular
SIRT4	ADP-ribosil transferasa	Mitocòndria	Metabolisme
SIRT5	Desacetilasa	Mitocòndria	Sistema nerviós
SIRT6	Desacetilasa i ADP-ribosil transferasa	Nucli i mitocòndria	Càncer, inflamació
SIRT7	Desacetilasa	Nucli (nuclèol)	Sistema cardiovascular

Taula 3. Sirtuïnes en mamífers.

Aquestes tenen la capacitat de treure els grups acetil de lisines tant en histones, -produint el silenciament de la transcripció-, com en altres proteïnes, per això reben el nom també de desacetilases de lisina. Per cada grup acetil extret, es requereix una molècula de NAD^+ (*nicotinamide adenine dinucleotide*), igual que per cada grup ADP-ribosil que es transfereix en el cas d'algun tipus de sirtuïna. Aquestes proteïnes s'han conservat des de bactèries fins a mamífers. Així, en humans trobem 7 homòlegs (SIRT1-7), les quals tenen diferent activitat enzimàtica, localització cel·lular i funcions (Donmez, 2012; Smith et al., 2008; Zhang et al., 2011) (Veure Taula 3). Diferents estudis estableixen que les sirtuïnes estarien modulant algunes de les malalties associades a l'envelliment, entre les quals destaquen les malalties metabòliques, inflamatòries, cardiovasculars, el càncer i les malalties neurodegeneratives (Donmez, 2012; Donmez i Guarente, 2010).

4.1.1 Sirtuïna 1

Característiques

Si ens centrem en la sirtuïna 1 (SIRT1), homòleg de Sir2 en llevats, aquesta es troba principalment en el nucli, desacetilant a més de les histones, diferents factors de transcripció com p53, NF- κ B i PGC-1 α (Pallàs et al., 2008b). Una de les accions per la qual va despertar interès SIRT1, és per estar implicada en l'augment de l'esperança de vida induïda per restricció calòrica (RC) en diferents espècies, en llevats i fins i tot en ratolins (Guarente, 2007). A més, compostos com el resveratrol l'activen, allargant l'esperança de vida tant en llevats com en ratolins (Baur et al., 2006; Howitz et al., 2003). Per tant, SIRT1 es considera una diana antienvelliment. A nivell molecular, degut a la seva activitat desacetilasa, intervé en una àmplia varietat de processos: en el metabolisme, supervivència cel·lular i autofàgia (Gan i Mucke, 2008). Així, al desacetilar p53, es disminueix l'activitat proapoptòtica d'aquesta; si NF- κ B és desacetilada, disminueixen els seus efectes proinflamatoris; i si es desacetila PGC-1 α , es promou la biogènesi mitocondrial. Tots aquests efectes, entre d'altres, tenen lloc en teixits i òrgans com el fetge, múscul esquelètic, pàncrees i teixit adipós; i tot plegat es considera que contribuirà a l'augment de l'esperança de vida per RC (Imai i Guarente, 2010). També a nivell cerebral, SIRT1 s'expressa en l'hipotàlem, regulant aspectes com la temperatura corporal, la gana i l'activitat física (Dietrich et al., 2010; Satoh et al., 2010). En aquesta tesi em centraré en la seva localització a nivell de l'hipocamp i còrtex cerebral on exerceix els seus efectes

neuroprotectors, regulant les anteriors dianes i d'altres com veurem més endavant (Tang, 2009; Zhang et al., 2011).

SIRT1 és troba regulada tant a nivell transcripcional, com de la seva activitat (Zhang et al., 2011). Així, els factors de transcripció E2F1 (*E2F transcription factor 1*), la família FOXO (*Forkhead box proteins*), FOXO1 i 3a, i el receptor nuclear TLX, indueixen l'expressió de SIRT1; mentre que el factor HIC1 (*Hypermethylated in cancer 1*), p53 i PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*), la redueixen. Durant una situació d'estrès per la cèl·lula, SIRT1 regula la seva activitat formant complexos amb dues proteïnes: augmenta la seva activitat al unir-se a AROS (*active regulator of SIRT1*), mentre que quan interacciona amb DBC1 (*deleted in breast cancer-1*) s'inhibeix. L'activitat de SIRT1 també és modulada per modificacions post-transcripcionals. Així, l'addició d'un grup SUMO (*small ubiquitin-like modifiers*) activa SIRT1, mentre que la fosforilació pot activar-la, i en algun cas inhibir-la. D'altra banda, SIRT1 és sensible a l'estat oxidatiu de la cèl·lula. Així, el producte resultant de l'oxidació lipídica 4-HNE, inhibeix l'activitat de SIRT1 i també augmenta la seva degradació mitjançant el proteosoma. A nivell farmacològic, productes com el EX-527, el sirtinol i l'esplitomicina, inhibeixen a SIRT1, mentre que els polifenols resveratrol, quercetina, curcumina i catequines, l'activen. I per últim, es coneix que l'activitat de SIRT1 també és regulada a nivell metabòlic. Anteriorment hem comentat que un dels substrats necessaris per a que actuï SIRT1 és el NAD⁺. Així, SIRT1 li transfereix a NAD⁺ un grup acetil des del substrat proteic al qual desacetila. Aquest fet provoca la desestabilització i posterior fragmentació del NAD⁺ acetilat, donant com a resultat una molècula de nicotinamida, la qual inhibeix a SIRT1. Pel que fa a NAD⁺, es coneix que la RC i també l'exercici físic augmenten el ràtio NAD⁺/NADH, i conseqüentment, activen SIRT1. A nivell cel·lular, podem augmentar els nivells de NAD⁺ estimulant la seva síntesi, en què jugaria un paper important l'enzim limitant de la via, el NAMPT (*nicotinamide phosphoribosyltransferase*). Aquest enzim catalitza la formació de nicotinamida a nicotinamida mononucleòtid, que posteriorment utilitzarà l'enzim NMNAT-1 (*nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 1*) per obtenir el NAD⁺. Alhora SIRT1 regula la transcripció de NAMPT (Nakahata et al., 2009). Així, la regulació de l'activitat de SIRT1 per NAD⁺ estableix una relació entre el metabolisme cel·lular i la transcripció de gens a través de la desacetilació de proteïnes, sent la síntesi de NAD⁺ clau en l'augment de l'esperança de vida per RC (Zhang et al., 2011). Cal dir que, a nivell experimental, molts dels beneficis de la RC observats en rosegadors,

suposa un descens del 30-60% de la ingesta calòrica, això si, sense malnutrició. Xifres que difícilment es poden aplicar a les persones, sobretot en persones grans. A més, la RC produeix tot un conjunt “d’efectes adversos” com l’osteoporosi, la infertilitat i fins i tot alteracions de l’estat d’ànim amb depressió. Per tant, s’haurien d’aplicar règims menys intensos o l’ús de compostos que mimetitzin a la RC. Altra alternativa més plausible seria la pràctica d’exercici físic sol o en combinació amb una RC lleu (Dirks i Leeuwenburgh, 2006; Mercken et al., 2012).

SIRT1, envelliment i malalties neurodegeneratives

En el cervell adult, SIRT1 s’expressa de manera important en l’hipocamp, còrtex cerebral, cerebel, estriat i hipotàlem, i majoritàriament es troba en neurones, exercint els seus efectes neuroprotectors (Ramadori et al., 2008; Zhang et al., 2011). Diferents autors destaquen la implicació de SIRT1 en els processos d’aprenentatge i memòria, on a nivell de l’hipocamp regula aspectes relacionats amb la plasticitat sinàptica (Gao et al., 2010; Michán et al., 2010). A nivell cerebral, s’ha observat un descens dels nivells de SIRT1 amb l’edat (Koltai et al., 2011) i en malalties neurodegeneratives (Julien et al., 2009; Pallàs et al., 2008a); i diferents autors estableixen que el paper neuroprotector de SIRT1 podria estendre’s a neurones en estat de neurodegeneració (Araki et al., 2004; Kim et al., 2007; Pfister et al., 2008).

Estudis tant *in vitro* com *in vivo* destaquen el paper neuroprotector que tindria el resveratrol i la RC activant a SIRT1. Així, el tractament amb resveratrol va disminuir el procés neurodegeneratiu en diferents models de malaltia d’Alzheimer i ELA; produint-se una millora en el deteriorament cognitiu dels animals (Kim et al., 2007). Quant a la RC, estudis com el de Qin et al. (2006) en ratolins confirmen l’augment dels nivells de NAD⁺, juntament amb un augment de l’activitat i també dels nivells proteics de SIRT1. No solament el resveratrol i la RC modulen a SIRT1, estudis recents estableixen que l’exercici físic augmenta els nivells proteics de SIRT1 en l’hipocamp de rates joves (3 mesos) i ratolins adults (9 mesos) (Falone et al., 2012; Gomez-Pinilla i Ying, 2010).

D’altra banda, en la malaltia d’Alzheimer i altres tautopaties no tan sols és important considerar l’augment dels nivells de fosforilació de la proteïna tau, sinó que també s’ha de tenir en compte l’estat d’acetilació. Així, l’augment dels nivells de tau acetilada causa la desestabilització dels microtúbuls, observant-se en ratolins transgènics i mostres de malalts d’Alzheimer un augment conjunt tant de l’acetilació de tau com de la

seva fosforilació (Cohen et al., 2011); on possiblement, l'acetilació de tau és *a posteriori* de la seva fosforilació (Irwin et al., 2012). A més, tau acetilada colocalitza amb els agregats de tau i de β -amiloide. Cal destacar aquí el paper de SIRT1, la qual interacciona directament amb tau i la desacetila, augmentant la seva degradació pel proteosoma; i que el tractament amb resveratrol augmenta aquest procés d'eliminació de tau (Min et al., 2010). Per tant, es consideraria una bona estratègia terapèutica preventiva el promoure la desacetilació de tau amb l'objectiu de reduir la seva agregació, la qual es produeix tant en l'envelliment com en la malaltia d'Alzheimer i altres tautopaties.

La disfunció mitocondrial té lloc durant l'envelliment i en diferents malalties neurodegeneratives, en què estaria implicat el dany per estrès oxidatiu (Lin i Beal, 2006). SIRT1 interacciona amb AMPK (*AMP-activated protein kinase*) i activa per desacetilació a PGC-1 α (Nemoto et al., 2005). Aquesta última promourà l'expressió de gens que codifiquen per subunitats de la cadena respiratòria mitocondrial i altres proteïnes necessàries pel correcte funcionament de la mitocòndria, a més de gens relacionats amb el metabolisme energètic i que codifiquen per a enzims antioxidants (Cantó i Auwerx, 2009; Scarpulla, 2011). Se sap que tant l'exercici físic com la restricció calòrica augmenten el ratio AMP/ATP. Aquest fet activa AMPK, la qual fosforilarà a PGC-1 α activant-la. Un cop fosforilada, PGC-1 α serà desacetilada per SIRT1, i ara sí, activarà l'expressió de diferents gens (Cantó i Auwerx, 2009; Ruderman et al., 2010). D'altra banda, AMPK està implicada en la producció de NAD⁺, el qual activa a SIRT1 (Cantó et al., 2009). També SIRT1 pot regular l'activació d'AMPK al desacetilar la cinasa activadora d'AMPK, LKB1 (*liver kinase B1*), la qual fosforila la subunitat α de l'AMPK en el residu de treonina 172. Aquesta és la subunitat catalítica de l'AMPK, on resideix la seva activitat cinasa, i és essencial que estigui fosforilada perquè AMPK sigui activa (Hardie, 2007). Altres autors proposen que aquest mecanisme d'activació d'AMPK per LKB1 és independent de SIRT1 (Dasgupta i Milbrandt, 2007). Pel que fa al resveratrol, se sap que a dosis baixes-moderades ($\leq 25 \mu\text{M}$) activa SIRT1, però a dosis altes ($\geq 50 \mu\text{M}$), activaria també a AMPK. A aquestes dosis però, tindria efectes tòxics per a la cèl·lula ja que disminuirien els nivells d'ATP (Price et al., 2012) (Figura 5). Estudis com el de Wareski et al. (2009), confirmen el paper de PGC-1 α i SIRT1 en la biogènesi mitocondrial a nivell neuronal. A més, es coneix també que els nivells de PGC-1 α disminueixen en malalties neurodegeneratives (Cui et al., 2006; Qin et al., 2009). Així, tant els nivells de PGC-1 α com la seva activació per SIRT1 tindrien un paper clau en la biogènesi mitocondrial.

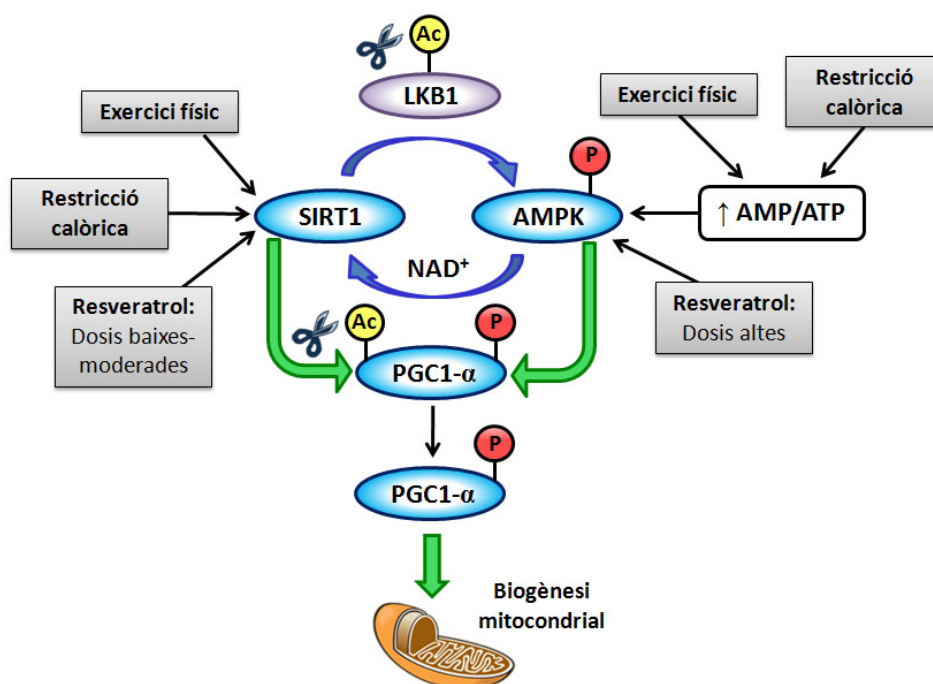


Figura 5. Activació de la via SIRT1-AMPK- PGC-1 α i el seu paper en la biogènesi mitocondrial.

Un altre mecanisme observat en l'envelliment i en diferents malalties neurodegeneratives és el procés inflamatori induït per la microglia, el qual contribuiria al deteriorament cognitiu (Jurgens i Johnson, 2012; Zilka et al., 2012). Diferents estudis destaquen el paper de SIRT1 modulant aquest procés inflamatori. Així, Chen et al. (2005) van demostrar com el tractament amb resveratrol i també la sobreexpressió de SIRT1 disminueixen l'acetilació del factor NF- κ B, i per tant el procés inflamatori induït per la microglia. SIRT1 també desacetila el receptor nuclear LXR (*liver X receptor*) i l'activa, reduint així el procés inflamatori (Li et al., 2007; Zelcer et al., 2007).

Per tant, l'activació de SIRT1 es consideraria una bona estratègia terapèutica encaminada a millorar alguns processos relacionats amb el deteriorament cognitiu associat a l'envelliment, i també, a prevenir i inclús tractar malalties neurodegeneratives com la malaltia d'Alzheimer. Però cal tenir en compte alguns inconvenients com són el nombrós grup de dianes que té SIRT1, l'activació o inhibició de les quals podria no ser beneficiosa. I un altre factor a tenir en compte és que els fàrmacs dissenyats tinguin la capacitat de travessar la barrera hematoencefàlica i així poder actuar a nivell central activant a SIRT1 (Donmez, 2012).

SIRT1, malalties metabòliques i cardioprotecció

El descobriment de què l'activitat desacetilasa de Sir2 en llevats i SIRT1 en mamífers era dependent de NAD^+ , va establir la possible implicació d'ambdues en la regulació d'aspectes relacionats amb el metabolisme (Donmez i Guarente, 2010). A continuació parlarem de les accions de SIRT1 a nivell metabòlic en els diferents teixits i òrgans estudiats en aquesta tesi doctoral: el múscul esquelètic, el fetge i el cor.

A nivell del **múscul esquelètic**, SIRT1 regularia aspectes com la biogènesi mitocondrial i el metabolisme dels àcids grassos i la glucosa. Així, davant d'uns nivells baixos de glucosa, s'activarien vies d'oxidació d'àcids grassos enfront d'oxidació de la glucosa, en què estaria implicada l'activació de PGC-1 α per SIRT1 (Gerhart-Hines et al., 2007). Es coneix que la RC augmenta la sensibilitat a la insulina a través de la modulació de la via PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) per SIRT1 (Schenk et al., 2011). L'administració de resveratrol produiria efectes semblants, a més de millorar la capacitat aeròbica i la fatiga muscular (Lagouge et al., 2006). En estudis *in vitro* es va determinar que el resveratrol incrementava la captació de glucosa pel múscul per un mecanisme independent d'insulina, en què estaria implicada l'activació d'AMPK per SIRT1 i el posterior augment d'activitat del transportador de glucosa GLUT4 (Breen et al., 2008).

Es coneix que l'exercici físic activa la via de SIRT1, observant-se en rates un augment dels nivells proteics tant de SIRT1 com de PGC-1 α , junt amb un increment dels nivells proteics del citocrom c, el qual participa en la cadena respiratòria mitocondrial i és un indicador indirecte del contingut mitocondrial. A més, també augmenta els nivells del transportador de glucosa GLUT4 i de l'enzim MCAD (*medium chain fatty acyl-CoA dehydrogenase*), el qual està implicat en l'oxidació dels àcids grassos (Suwa et al., 2008). També l'exercici produeix un increment tant dels nivells proteics com de l'activitat dels complexos I i IV de la cadena respiratòria mitocondrial (sistema OXPHOS), i també augmenta l'activitat de l'enzim citrat sintasa (CS, enzim metabòlic) (Li et al., 2011). Altres autors, malgrat no determinar un augment ni del contingut de SIRT1 ni de la seva activitat, sí que van establir un increment de l'expressió de diferents complexos que formen part del sistema OXPHOS (Huffman et al., 2008), i del citocrom c (Chabi et al., 2009), possiblement degut a la durada del protocol d'exercici aplicat.

Estudis en humans confirmen els resultats observats en rosegadors. Així, l'exercici produeix un increment dels nivells de SIRT1 i de PGC-1 α , acompanyat per un augment de

l'expressió i activitat dels enzims mitocondrials citocrom c oxidasa i CS, i dels nivells de GLUT4 (Little et al., 2010). L'exercici físic també augmentaria els nivells de l'enzim NAMPT, junt amb un increment del complex III mitocondrial, dels nivells d'ATP, de la capacitat aeròbica màxima i de la sensibilitat a la insulina, a més de produir una reducció del greix corporal (Costford et al., 2010).

Pel que fa al **teixit hepàtic**, SIRT1 estaria implicada en la biogènesi mitocondrial i en el metabolisme de la glucosa, els àcids grassos i el colesterol. En una situació de dejú, el fetge activarà vies gluconeogèniques i d'oxidació d'àcids grassos amb la finalitat de mantenir el balanç energètic, on l'activació de PGC-1 α per SIRT1 tindria un paper clau (Rodgers et al., 2005). Així, ratolins *knockdown* de SIRT1 sotmesos a una situació de dejú, presentaven una disminució de l'expressió de gens gluconeogènics i d'enzims implicats en l'oxidació d'àcids grassos i el metabolisme del colesterol. Aquest fet es va correlacionar amb uns nivells de glucosa més baixos en sang i una menor producció de glucosa hepàtica, a més de presentar un major emmagatzematge hepàtic tant d'àcids grassos com de colesterol (Rodgers i Puigserver, 2007). Li et al. (2007) destaquen també el paper de SIRT1 en la regulació del metabolisme del colesterol i triglicèrids a través de la seva interacció amb el receptor nuclear LXR. D'altra banda, l'administració de resveratrol a ratolins, reverteix el dany hepàtic i l'augment del contingut lipídic causat per una dieta hipercalòrica, a més d'incrementar el nombre de mitocòndries (Baur et al., 2006). A més, el resveratrol va millorar la sensibilitat a la insulina, i sorprenentment, va augmentar l'esperança de vida dels animals junt amb una millora de la funció locomotora. Estudis *in vitro* amb hepatòcits humans confirmen un cop més al resveratrol com un activador de SIRT1, amb la posterior activació d'AMPK per desacetilació d'LKB1, donant com a resultat una disminució del contingut lipídic cel·lular (Hou et al., 2008).

L'exercici també produeix en fetge un augment tant dels nivells proteics de SIRT1 com d'AMPK fosforilada, el que es va correlacionar amb un augment del citocrom c oxidasa (subunitat IV) (E et al., 2013), confirmant-se també a nivell hepàtic el paper de PGC-1 α en la biogènesi mitocondrial (Haase et al., 2011).

Per últim, a nivell **cardíac**, SIRT1 estaria regulant tot un conjunt d'efectes beneficiosos. Així, SIRT1 disminuiria els processos inflamatoris i apoptòtics al desacetilar a NF- κ B (Nadtochiy et al., 2011). També, davant d'un procés d'isquèmia-reperfusió

cardíaca, SIRT1 exerciria tot un conjunt d'efectes cardioprotectors disminuint el teixit infartat mitjançant: augment dels nivells de la proteïna antiapoptòtica BCL-XL (*B-cell lymphoma-extra large*) junt amb el descens de proteïnes proapoptòtiques, com són BAX (*Bcl-2-associated X protein*) i la fragmentació (i per tant, l'activació) de la caspasa 3; a més d'incrementar Mn-SOD junt amb un menor dany oxidatiu del DNA (Hsu et al., 2010).

L'exercici físic també va augmentar a nivell cardíac l'activitat de SIRT1 i els nivells dels enzims antioxidants Mn-SOD i CAT, junt amb un menor dany oxidatiu lipídic (Ferrara et al., 2008). Aquest fet es va determinar en rates velles (24 mesos). En canvi, en ratolins joves (3 mesos), els nivells proteics de SIRT1 i de PGC-1 α no van variar, igual que la quantitat i l'activitat de diferents complexos del sistema OXPHOS (Li et al., 2011).

Així doncs, hem vist com SIRT1 a nivell perifèric produiria tot un conjunt d'accions beneficioses relacionades amb el metabolisme (Figura 6). Per tant, la seva activació per restricció calòrica o per la pràctica d'exercici físic, -ambdós pilars fonamentals de la terapèutica actual per fer front a la síndrome metabòlica-, junt amb l'ús de compostos com el resveratrol, es consideraria una bona estratègia preventiva i també terapèutica de les malalties cardiovasculars, la diabetis de tipus II i l'obesitat (Ferrara et al., 2008; Lagouge et al., 2006; Nogueiras et al., 2012).

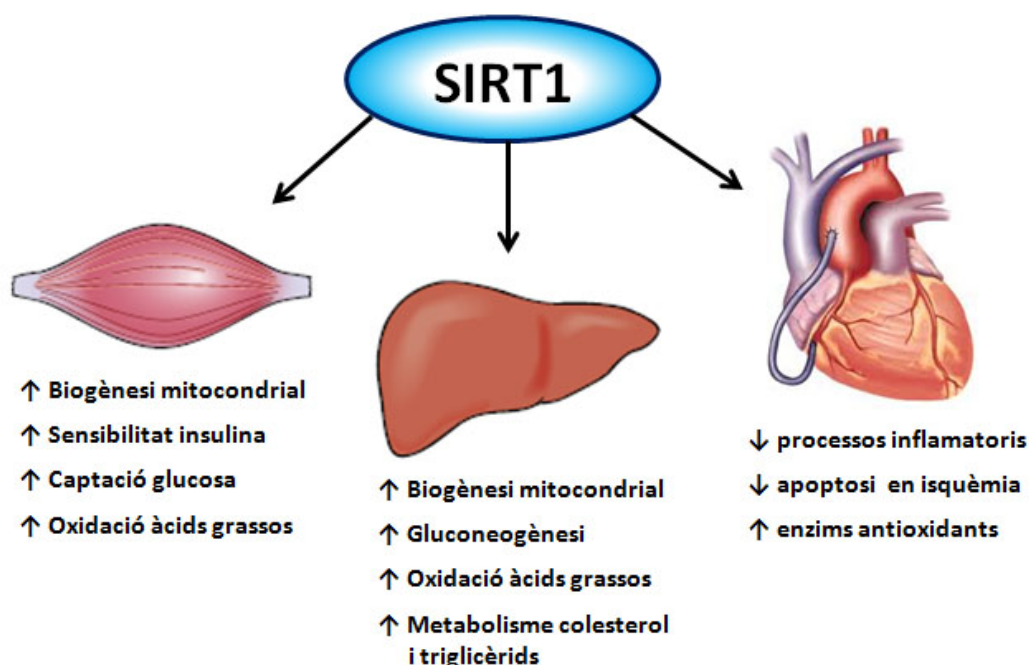


Figura 6. Efectes beneficiosos a nivell perifèric mediat per SIRT1.

4.2 El procés d'autofàgia

Introducció

Durant l'envelliment, resulten afectades diferents funcions cel·lulars, com és el metabolisme oxidatiu, i també importants orgànuls, com la mitocondria, els lisosomes i el reticle endoplasmàtic (RE). A més, l'envelliment es caracteritza per una pèrdua dels mecanismes de manteniment i reparació cel·lulars, conduint a una acumulació de macromolècules i orgànuls defectuosos. Aquesta acumulació redueix l'eficàcia molecular i cel·lular dels processos biològics que són importants pel manteniment de l'homeòstasi i supervivència de la cèl·lula. Conseqüentment, es limitarà l'esperança de vida i augmentarà el risc de patir diferents malalties associades amb l'envelliment, com pot ser el càncer, les malalties infeccioses i les malalties neurodegeneratives (Rezzani et al., 2012).

L'homeòstasi cel·lular requereix d'un equilibri entre els processos de biosíntesi i catabòlics. Així doncs, les cèl·lules eucariotes disposen de dos mecanismes de degradació: el proteosoma (*ubiquitin-proteosome pathway* o *UPS*) i l'autofàgia. Ambdós tenen la capacitat d'eliminar proteïnes defectuoses, però sols el mecanisme d'autofàgia pot eliminar orgànuls sencers i fins i tot microorganismes. Dintre de les proteïnes a ser eliminades per un o altre mecanisme, cal indicar que l'UPS és focalitza més en les proteïnes de vida curta (com poden ser els factors de transcripció o proteïnes que participen en el cicle cel·lular), mentre que l'autofàgia eliminaria les proteïnes de vida més llarga. A més, tots dos processos estarien relacionats entre si (Clague i Urbé, 2010; Korolchuk et al., 2010; Levine i Kroemer, 2008; Mizushima i Komatsu, 2011; Rezzani et al., 2012).

El **sistema UPS**, és un sistema d'eliminació de proteïnes defectuoses altament selectiu, ja que té la capacitat d'eliminar proteïnes citosòliques, nuclears i del RE que estan ubiquitinitzades. La ubiquitina és una proteïna de mida petita (76 aminoàcids), que és afegida en residus de lisina a les proteïnes a eliminar -mínim, una cadena de quatre unitats d'ubiquitina- per l'enzim E3 (o enzim ligasa de la ubiquitina). Posteriorment, aquestes proteïnes seran reconegudes i degradades finalment pel proteosoma per proteòlisi (Ciechanover, 2005; Clague i Urbé, 2010; Hanna et al., 2007; Rezzani et al., 2012).

D'altra banda, l'**autofàgia** és el major sistema de degradació intracel·lular, en què diferents components citoplasmàtics, des de proteïnes, lípids i carbohidrats fins a orgànuls (de la mitocondria, es parla de mitofàgia; del RE, parlem de REfàgia o reticulofàgia; i dels peroxisomes, es parla de pexofàgia), són alliberats i digerits als lisosomes. Hi ha tres tipus

d'autofàgia: la macroautofàgia, la microautofàgia i l'autofàgia mediada per xaperones (Figura 7).

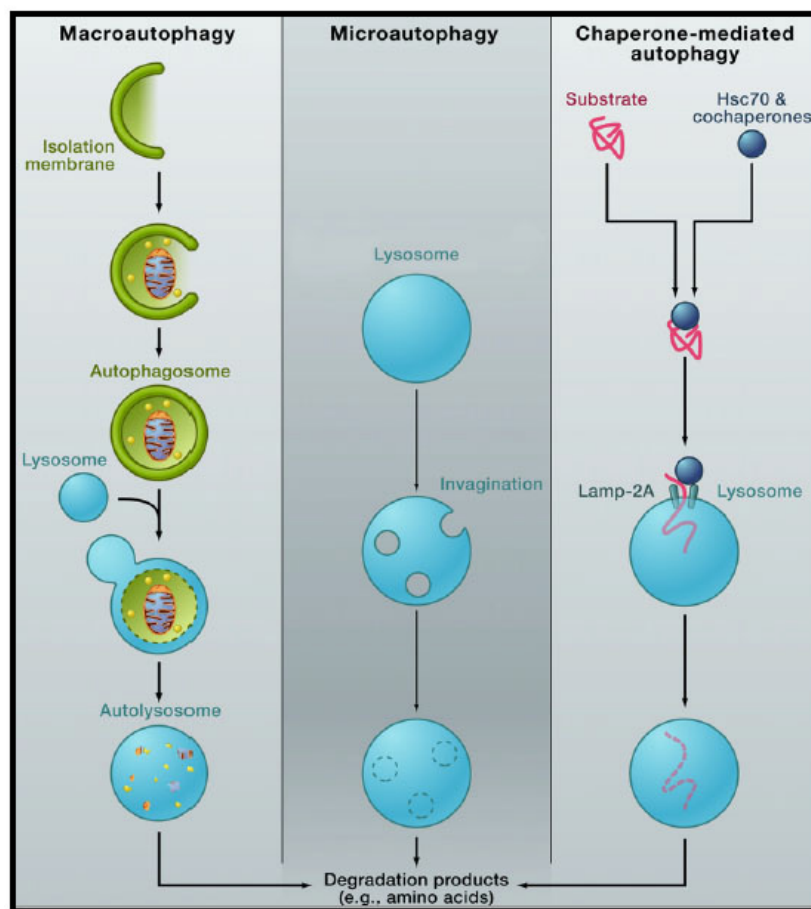


Figura 7. Diferents tipus d'autofàgia (Modificat de Mizushima i Komatsu, 2011).

En la macroautofàgia, una porció de doble membrana anomenada fagòfor, engloba una petita porció de citoplasma, incloent materials solubles i orgànuls, constituint-se l'autofagosoma. Aquest es fusionarà amb el lisosoma formant-se l'autolisosoma, on es degradaran els components segregats per acció de les hidrolases lisosomals. En la microautofàgia, és el propi lisosoma qui engloba petits components del citoplasma per invaginació de la seva pròpia membrana. Per últim, en l'autofàgia mediada per xaperones (CMA, de l'anglès *chaperone-mediated autophagy*), les proteïnes que contenen un pentapèptid específic (KFERQ o combinacions d'aminoàcids amb les mateixes propietats biofísiques) són reconegudes per la xaperona Hsc70 (*heat shock cognate 70*) i coxaperones. Hsc70 conduirà la proteïna a eliminar cap al lisosoma, on la proteïna transmembrana LAMP-2A (isoforma de LAMP-2, *lysosome-associated membrane*

glycoprotein 2) actua de receptor, formant un complex multimèric i permetent que la proteïna desplegada es transloqui finalment a l'interior del lisosoma per degradar-se. Se sap que els diferents tipus d'autofàgia no són independents entre si. Aquests poden actuar conjuntament o fins i tot, és possible que l'estimulació d'un tipus pugui activar a un altre, depenent de l'estímul o dels requeriments cel·lulars (Koga i Cuervo, 2011; Mizushima i Komatsu, 2011; Pallauf i Rimbach, 2012; Rezzani et al., 2012; Tanida, 2011). Cal remarcar que la macroautofàgia és el principal tipus d'autofàgia i el més estudiat en relació a la microautofàgia i l'autofàgia mediada per xaperones (Mizushima i Komatsu, 2011). Per tant, a partir d'ara, em referiré a la macroautofàgia simplement com a autofàgia, la qual en parlarem tot seguit amb més detall.

Mecanismes moleculars en l'autofàgia (macroautofàgia)

L'autofàgia es pot activar en resposta a senyals tant intra com extracel·lulars, com poden ser l'estrès oxidatiu, diferents factors de creixement, l'estrès del RE i en situacions de manca de nutrients. Així, l'autofàgia contribueix a la supervivència de la cèl·lula mantenint el balanç energètic en una situació de manca de nutrients, i en el recanvi d'òrgans danyats. D'altra banda, se l'ha relacionat amb tot un conjunt de patologies, com són les malalties neurodegeneratives, la tumorigènesi, la diabetis de tipus II i el fetge gras, els processos infecciosos i fins i tot, amb vies moleculars relacionades amb la longevitat, en què trobem a SIRT1 (Caballero i Coto-Montes, 2012; Rubinsztein et al., 2011; Salminen i Kaarniranta, 2009; Tanida, 2011).

Des de la formació del fagòfor, fins a la digestió final pels lisosomes, aquest procés d'autofàgia comprèn tot un conjunt d'etapes en què participen nombroses proteïnes. A continuació, parlarem de cadascuna de les diferents etapes, fent èmfasi en les proteïnes estudiades en aquesta tesi doctoral (Figura 8).

En l'etapa d'iniciació, es produeix la formació del fagòfor, el qual és una doble o múltiple membrana procedent del RE que englobarà el material a ser eliminat. Alguns autors proposen que aquesta membrana pot provenir també de l'aparell de Golgi, de la membrana plasmàtica o de la mitocòndria. I és la cinasa inhibidora de l'autofàgia, mTOR (*mammalian target of rapamycin*), la qual forma part del complex anomenat TORC1, (*target of rapamycin complex 1*) la que tindria un paper destacat en la regulació de l'autofàgia. mTOR és inhibida (i per tant, s'activa l'autofàgia) de manera directa pel

compost rapamicina i també en situacions de manca de nutrients de manera indirecta, en què estaria implicada l'AMPK i també SIRT1. Així, quan el ràtio AMP/ATP augmenta, s'activa AMPK, el qual inhibeix mTOR de manera indirecta, a l'activar un inhibidor d'aquest, el complex TSC1/2 (*tuberous sclerosis complex 1/2*). També AMPK pot activar l'autofàgia independentment d'mTOR, al fosforilar ULK1 (*unc-51-like kinase 1*); o mitjançant SIRT1, la qual activa a través de FOXO la transcripció de gens Atg implicats en el desenvolupament del procés d'autofàgia. Si recordem, la manca de nutrients amb el conseqüent augment de NAD^+ , també activaria a SIRT1.

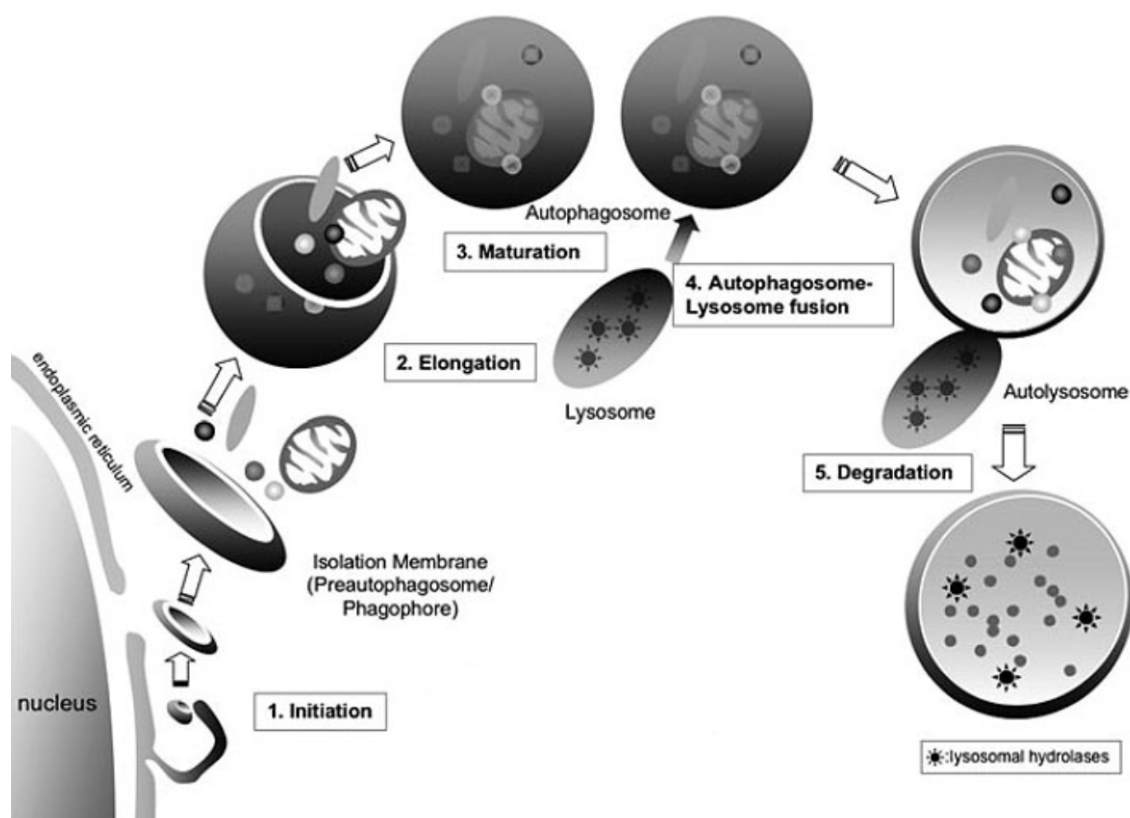


Figura 8. Etapes del mecanisme de macroautofàgia (Modificat de Tanida, 2011).

D'altra banda, la insulina i els factors de creixement IGF a través de la via PI3K de classe I/Akt, i també l'augment dels nivells d'aminoàcids cel·lulars, activen a mTOR (es bloqueja l'autofàgia), inhibint així el complex ULK1. Quan és induït el procés d'autofàgia, aquest complex s'activa i va al RE, on conjuntament amb el complex PI3K de classe III, i del qual Beclina 1 i Vps34 en formen part, iniciaran el procés de formació del fagòfor. Cal dir que, Beclina 1 està inhibida a l'interaccionar amb la proteïna antiapoptòtica BCL-2 (*B-cell lymphoma-2*). Així, una de les vies d'activació de l'autofàgia independent d'mTOR

es produeix per la pèrdua de la interacció entre BCL-2 i Beclina 1, degut a la fosforilació de BCL-2 per JNK1 o de Beclina 1 per DAPK (*death-associated-protein-kinase*) (Figura 9).

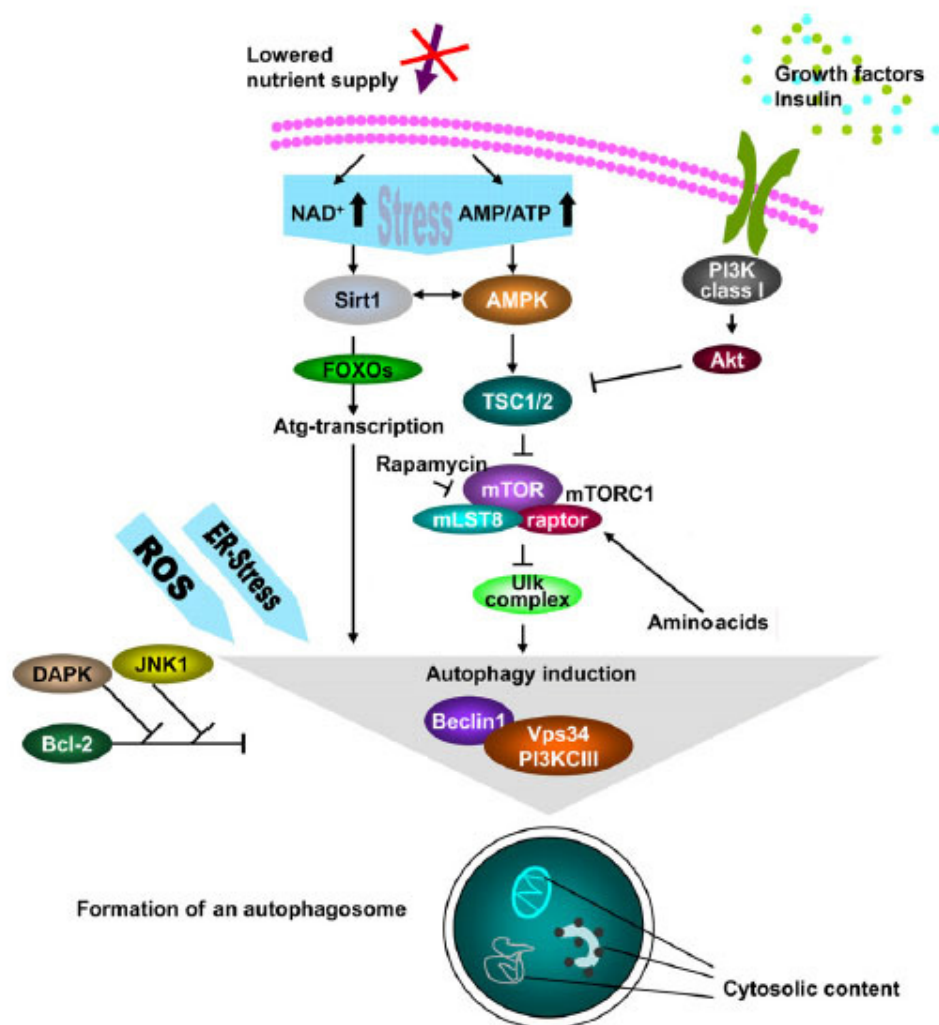


Figura 9. Vies moleculars implicades en la inducció de l'autòfàgia (Modificat de Pallauf i Rimbach, 2012).

Posteriorment, té lloc el procés d'elongació i maduració de l'autòfagosoma, on diferents complexos de proteïnes Atg junt amb la proteïna LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*) conjugada amb el fosfolípid fosfatidiletanolamina (*phosphatidylethanolamine* o *PE*), realitzaran l'elongació i el tancament del fagòfor. En cèl·lules de mamífer, existeixen tres isoformes d'LC3 (LC3A, LC3B i LC3C) les quals presenten diferent funció i distribució en els teixits, sent LC3B la més adient en l'estudi del procés d'autòfàgia. LC3 és sintetitzada com a proLC3, la qual es fragmentada per Atg4B

donant lloc a LC3-I. LC3-I està present al citosol, i quan s'activa l'autofàgia, el complex Atg12-Atg5-Atg16L realitza la unió covalent entre LC3-I i PE (parlem aleshores de LC3-II). LC3-II ara es localitza a l'autofagosoma, i per tant, es considera un bon marcador del procés d'activació de l'autofàgia en cèl·lules de mamífer (també el quocient LC3-II/LC3-I). Atg4B traurà els grups PE d'LC3-II, reciclant LC3-I per subsegüents formacions de nous autofagosomes.

Finalment, es produeix la fusió del lisosoma amb l'autofagosoma, formant-se l'autolisosoma. Aquest procés requereix de la participació de la proteïna Rab7 junt amb el complex UVRAG-Vps34-Beclina 1-PI3K. Un cop format l'autolisosoma, les hidrolases lisosomals (com les catepsines) degradaran el contingut que contenia l'autofagosoma (Klionsky et al., 2012; Mizushima i Komatsu, 2011; Pallauf i Rimbach, 2012; Rezzani et al., 2012; Tanida, 2011).

Aquest procés d'autofàgia es coneix com a autofàgia basal, el qual és un sistema de control de qualitat dels components citoplasmàtics, sent crucial pel manteniment de l'homeòstasi de diferents cèl·lules postmitòtiques, com són les neurones i els hepatòcits. Però es requereix de l'autofàgia selectiva per mantenir un bon sistema de control de qualitat. Aquest sistema selectiu degrada proteïnes específiques, orgànuls i fins i tot bacteries invasores. Es produeix de manera constitutiva i també es pot induir en resposta a diferents estímuls d'estrès cel·lular.

I és la proteïna p62 (o sequestosoma 1, SQSTM1) qui tindria un paper destacat en aquest procés d'autofàgia selectiva. Aquesta proteïna té la capacitat d'unir-se a diferents elements ubiquitinitzats, des d'agregats proteics fins a mitocondries i inclús patògens; i d'interaccionar amb LC3, incorporant el material ubiquitinitzat a l'interior de l'autofagosoma. p62 és considerada un altre marcador del procés d'autofàgia. Així, la disfunció del procés d'autofàgia s'acompanya de l'acumulació a l'interior de la cèl·lula d'agregats que contenen p62 i ubiquitina. Aquests agregats s'han observat en malalties neurodegeneratives com la malaltia d'Alzheimer, Parkinson i ELA, en malalties hepàtiques com l'hepatitis alcohòlica i l'esteatosi hepàtica, i també en certs tipus de càncers, com el glioma maligne i el carcinoma hepatocel·lular (Johansen i Lamark, 2011; Mizushima i Komatsu, 2011; Tanida 2011).

Autofàgia, envelliment i malalties neurodegeneratives

Durant l'envelliment té lloc l'acumulació de diferents components cel·lulars que estan danyats o són defectuosos (DNA, proteïnes, lípids i orgànuls), fet que conduirà a un deteriorament de les funcions fisiològiques de l'organisme. Aquesta acumulació estaria relacionada amb la pèrdua d'eficàcia dels mecanismes d'eliminació cel·lulars que té lloc en l'envelliment, tant del sistema UPS com de l'autofàgia. Així, si orgànuls danyats com la mitocondria no són eliminats, es generarà un augment de la formació de radicals lliures amb el consegüent dany oxidatiu. També, la reducció en el recanvi proteic exposaria a les proteïnes a patir les modificacions observades durant l'envelliment, com pot ser la formació de grups carbonils junt amb la possibilitat de formació d'agregats observats en diferents proteinopaties i malalties neurodegeneratives. D'altra banda, l'acumulació de lipofuscina (restes de lípids i proteïnes indigeribles) en l'interior dels lisosomes que té lloc en l'envelliment i malalties neurodegeneratives, redueix el procés d'autofàgia ja que dificulta la fusió dels lisosomes amb l'autofagosoma. En una situació d'estrès cel·lular, com pot ser l'acumulació de proteïnes i orgànuls danyats, i davant d'una situació de manca de nutrients, l'autofàgia s'activarà amb l'objectiu de mantenir la supervivència cel·lular. Així, el seu mal funcionament conduiria a l'envelliment cerebral, produint-se un deteriorament cognitiu i el desenvolupament de malalties neurodegeneratives. A més de prevenir la formació d'agregats proteics, a nivell cerebral l'autofàgia estaria implicada en la regulació de la ingesta i el balanç energètic (Caballero i Coto-Montes, 2012; Inoue et al., 2012; Nixon et al., 2008; Pallauf i Rimbach, 2012; Rezzani et al., 2012; Salminen i Kaarniranta, 2009; Wong i Cuervo, 2010).

Se sap que vies moleculars relacionades amb la resistència a l'estrès i la supervivència/longevitat regulen el procés d'autofàgia. Així, SIRT1 i les seves dianes p53, FOXO i NF- κ B, són potents reguladores de l'autofàgia: mentre que NF- κ B i p53 (quan està al citoplasma) la inhibeixen, SIRT1 i FOXO l'activen. A més, SIRT1 desacetilaria a p53 i FOXO, regulant així la seva contribució a la modulació de l'autofàgia (Figura 10). De totes elles en parlarem amb més detall a continuació.

Donat que l'acetilació regula el procés de formació de l'autofagosoma, el paper de les sirtuïnes esdevé important en el procés d'autofàgia. Així, estudis tant *in vitro* com *in vivo* en diferents teixits (cervell, fetge i cor) indiquen que SIRT1 és una important reguladora del procés d'autofàgia (Lee et al., 2008). A més, SIRT1 regularia l'activitat de diferents factors Atg (Atg5, Atg7 i Atg8), -els quals participen en la formació de

l'autofagosoma-, a l'interactuar amb ells i desacetilar-los. Altres estudis *in vitro* i *in vivo* amb el nemàtode *Caenorhabditis elegans*, van establir com la sobreexpressió de SIRT1, l'administració de resveratrol i la restricció calòrica estimulen l'autofàgia, a més d'augmentar la supervivència d'aquests nemàtodes. En canvi, la inhibició farmacològica de SIRT1 pel compost EX527, o mitjançant RNA d'interferència, la bloquegen (Morselli et al., 2010). Ghosh et al. (2010) van una mica més enllà i estableixen que seria la interacció de SIRT1 amb el complex TSC2 el que activaria l'autofàgia a través de la inhibició d'mTOR.

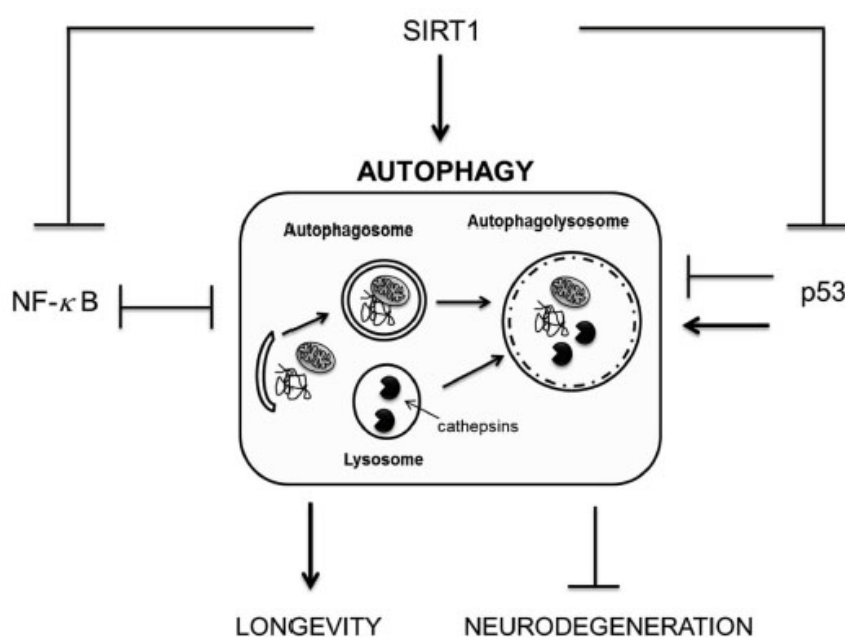


Figura 10. Regulació de l'autofàgia per SIRT1, p53 i NF-κB i el seu paper en la longevitat i el procés neurodegeneratiu (Caballero i Coto-Montes, 2012).

p53 té la capacitat d'activar vies moleculars que poden accelerar o alentir el procés d'envelliment cel·lular. De manera que una activació desmesurada de p53 produiria un excés de mort cel·lular, reduint la capacitat de regeneració tissular, conduint així a un envelliment prematur. En canvi, una activació ben regulada augmentaria la supervivència i reduiria el procés d'envelliment (Matheu et al., 2008, 2007). Referent a la regulació de l'autofàgia per p53, es coneix que quan està al citoplasma, -degut a la seva ubiquitinització (Kruse i Gu, 2009)-, reprimeix el procés d'autofàgia a través de la inhibició d'AMPK. Així, s'han determinat uns nivells de fosforilació menors d'AMPK, conjuntament amb uns nivells més alts de la cinasa p70S6 (p70S6K) fosforilada (Tasdemir et al., 2008b). p70S6K és una diana d'mTOR, la qual realitza un mecanisme de retroalimentació negativa de la via

PI3K de classe I activada per insulina (Klionsky et al., 2005), on l'augment de la seva fosforilació és indicador de l'activació d'mTOR. També, p53 quan es localitza en el citoplasma activaria l'apoptosi a través de la mitocondria (Tasdemir et al., 2008a, 2008b). D'altra banda, quan es troba en el nucli, p53 activaria l'expressió de gens proapoptòtics i de detenció del cicle cel·lular, i també de gens relacionats amb l'autofàgia. Així, p53 augmentaria l'expressió de Sestrin 1 i 2, les quals a més de tenir capacitat antioxidant activen a AMPK, i per tant, es promouria el mecanisme d'autofàgia (Budanov i Karin, 2008). A més, p53 induiria l'expressió de DRAM (*damage-regulated autophagy modulator*), la qual també participa en l'activació de l'autofàgia (Crichton et al., 2006). Així doncs, una activitat inapropiada de p53 contribuiria al procés neurodegeneratiu, ja sigui per inducció de la mort cel·lular per apoptosi o també per autofàgia, la qual rep el nom de mort cel·lular programada de tipus II, sent el mecanisme d'apoptosi la de tipus I. Cal dir que la mort per autofàgia mostra un mecanisme de retroalimentació negativa amb l'apoptosi: així, l'autofàgia desencadena la mort cel·lular quan l'apoptosi està inhibida, i viceversa (Caballero i Coto-Montes, 2012).

Per últim, es coneix que la inflamació i l'activació d'NF- κ B són ambdues potents inhibidores de l'autofàgia (Djavaheiri-Mergny et al., 2006; Salminen et al., 2012), i que aquesta alhora ho podria ser de l'activació d'NF- κ B (Djavaheiri-Mergny et al., 2007). Si recordem, anteriorment hem comentat que NF- κ B és activat per ROS. Per tant, és important considerar la interacció conjunta entre l'activació d'NF- κ B per l'estrès oxidatiu i l'activitat del procés d'autofàgia en la regulació del procés d'envelliment a nivell cerebral (Salminen et al., 2012). Així, la inflamació crònica observada en l'envelliment produïda per una activació d'NF- κ B contribuiria al mecanisme de neurodegeneració de dues maneres: per una deficient autofàgia en les neurones juntament amb l'activació de la mort i el procés inflamatori en astròcits (Caballero i Coto-Montes, 2012).

Vist que el procés autofàgic resulta alterat en les malalties neurodegeneratives, podem pensar que la seva estimulació resultaria beneficiosa per fer front a aquestes patologies. Aquesta afirmació seria vàlida en alguns casos, ja que hem de considerar quina etapa d'aquest procés resulta alterada: l'etapa d'iniciació de formació del fagòfor, el reconeixement adequat dels components a eliminar, o l'últim pas, la degradació pels lisosomes. Així, alteracions específiques d'alguna d'aquestes etapes s'han observat en diferents malalties neurodegeneratives (Wong i Cuervo, 2010) (Figura 11).

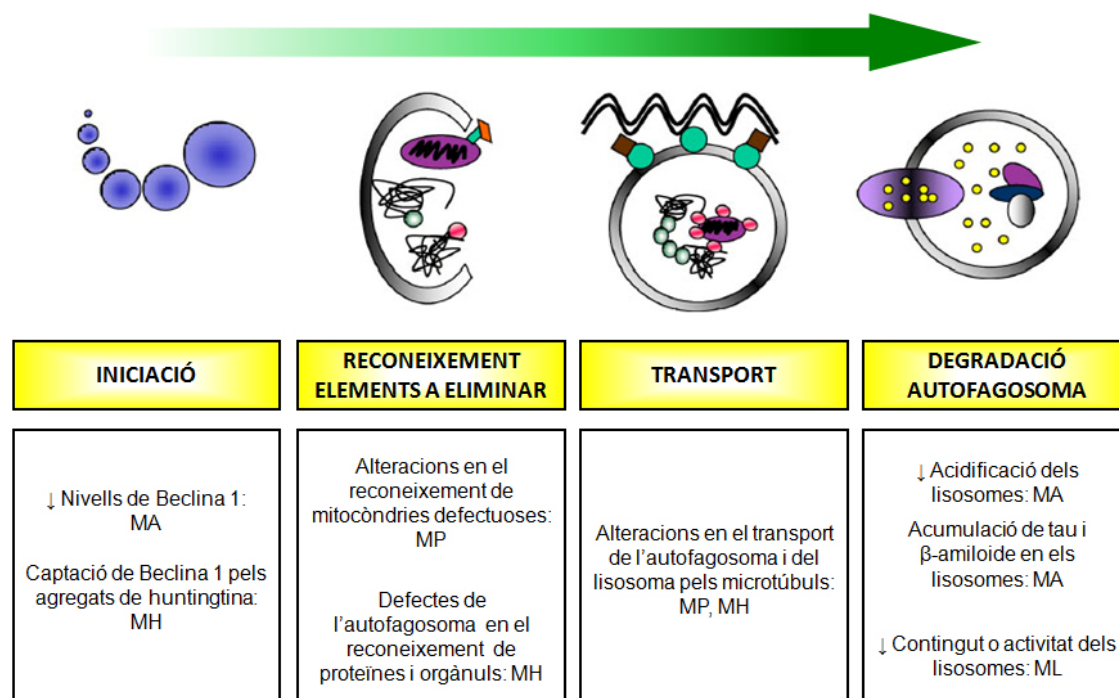


Figura 11. Etapes del procés d'autofàgia alterades en diferents malalties neurodegeneratives (Modificat de Rezzani et al., 2012).

MA, malaltia d'Alzheimer; MH, malaltia de Huntington; ML: malalties lisosomals; MP, malaltia de Parkinson.

En el procés d'iniciació de la formació del fagòfor té un paper clau la Beclina 1. Així, en el còrtex de persones d'edat avançada, persones amb MCI i en malalts d'Alzheimer s'han observat un descens en els nivells de Beclina 1, essent més acusat en aquests últims (Pickford et al., 2008; Shibata et al., 2006). En l'estriat de malalts de Huntington, Beclina 1 s'associa amb els agregats de huntingtina. Així, la disminució dels nivells de Beclina 1 amb l'edat, junt amb la seva captació pels agregats de huntingtina, -reduint així la seva funció-, contribuirien a l'evolució de la malaltia de Huntington (Shibata et al., 2006). D'altra banda, la inhibició d'mTOR amb rapamicina o un derivat de la mateixa (CCI-779), disminuiria els agregats de huntingtina a nivell de l'estriat, obtenint-se una millora de l'activitat locomotora i del comportament en ratolins transgènics (Ravikumar et al., 2004).

Pel que fa al reconeixement adequat dels elements a ser eliminats, cal destacar la funció que tindria la proteïna p62. Com anteriorment hem comentat, tant el sistema UPS com l'autofàgia, comparteixen mecanismes d'eliminació. Ambdós processos eliminaran proteïnes que han sigut ubiquitinitzades; mentre que les proteïnes ubiquitinitzades en Lys48 seran preferentment eliminades pel sistema UPS, les que ho són en Lys63, seran

eliminades per macroautofàgia. Així, p62 s'uneix preferentment a la superfície d'agregats proteics que contenen ubiquitina en Lys63 (Tan et al., 2008a, 2008b). Les propietats intrínseques dels agregats proteics junt amb les modificacions postraduccionals o les alteracions en la seva interacció amb els diferents elements de la maquinària autofàgica, poden comprometre la seva eliminació. Així, l'alteració en el reconeixement de mitocondries disfuncionals determinada en models de la malaltia de Parkinson, conduirien a l'acumulació d'aquestes, augmentant així l'estrès oxidatiu (Geisler et al., 2010). D'altra banda, en diferents models de malaltia de Huntington, s'ha observat que, malgrat la correcta formació dels autofagosomes i la seva digestió final pels lisosomes, el contingut dels autofagosomes era baix. Aquest fet podria ser degut a una deficiència en el reconeixement de la huntingtina mutada i altres elements citosòlics per part de l'autofagosoma (Martinez-Vicente et al., 2010).

Per últim, s'han observat alteracions en el procés de digestió final de l'autofagosoma pel lisosoma durant l'envelliment i en diferents malalties neurodegeneratives, determinant-se en les neurones afectades una acumulació de vacuoles autofàgiques (autofagosomes i autolisosomes) (Soontornniyomkij et al., 2012; Wong i Cuervo, 2010). Defectes en la mobilització dels autofagosomes des del lloc de formació cap als lisosomes o una fusió alterada entre les membranes d'ambdós, podrien ser les causes. Es coneix que modificacions postraduccionals com l'acetilació dels microtúbuls és clau per mobilitzar els autofagosomes i els lisosomes. Així, alteracions en l'estat d'acetilació i l'estructura dels microtúbuls s'han relacionat amb l'acumulació d' α -sinucleïna en la malaltia de Parkinson i de huntingtina en la malaltia de Huntington (Webb et al., 2004; Xie et al., 2010). En altres casos, es produeix la fusió autofagosoma-lisosoma, però la seva degradació és incompleta o inexistent. Canvis en el lumen del lisosoma, com pot ser la reducció de l'acidificació interna, així com l'acumulació de productes no digerits al seu interior, s'han descrit com a possibles causes d'aquest deteriorament. En malalts d'Alzheimer s'ha observat l'acumulació de vacuoles autofàgiques no digerides (Boland et al., 2008), on aquest i altres estudis tant *in vitro* com *in vivo* van confirmar que contenien filaments de proteïna tau i també β -amiloide (Nixon et al., 2005, Yu et al., 2005). Defectes en presenilina 1 o la presència de l'al·lel $\epsilon 4$ de l'apolipoproteïna E (ApoE4), estarien implicats en el descens de l'acidificació i l'increment dels nivells de β -amiloide en l'interior dels lisosomes respectivament. Tot plegat alteraria el funcionament dels lisosomes, causant neurodegeneració a nivell de

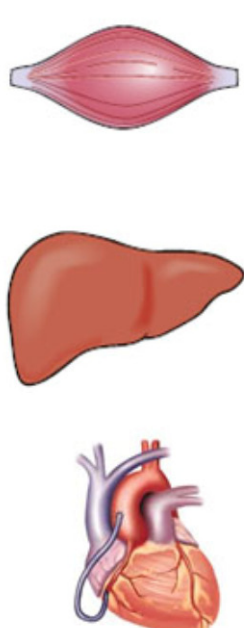
l'hipocamp i del còrtex entorrinal junt amb un deteriorament cognitiu (Belinson et al., 2008; Lee et al., 2010). Finalment, la disminució del contingut o l'activitat de les hidrolases lisosomals s'han descrit en tot un conjunt de patologies dintre de la denominació de malalties lisosomals, moltes de les quals presenten alteracions neurològiques i neurodegeneració (Settembre et al., 2008). Així, la potenciació de l'activitat dels lisosomes podria ser una possible estratègia terapèutica en la malaltia d'Alzheimer i altres malalties neurodegeneratives (Yang et al., 2011).

Resumint, defectes en el procés d'iniciació de la formació de l'autofagosoma o en el reconeixement dels elements a eliminar, comportaria la formació d'agregats proteics entre d'altres elements, o la generació de productes tòxics per a la cèl·lula (per exemple, la producció de ROS per mitocòndries danyades que no han sigut eliminades). D'altra banda, defectes en l'eliminació pels lisosomes, implicaria l'acumulació dels autofagosomes/autolisosomes. Així, la identificació de l'etapa/es que resulta alterada en el mecanisme d'autofàgia en l'envelliment i en les diferents malalties neurodegeneratives és clau per al desenvolupament d'una intervenció terapèutica adequada que moduli l'autofàgia amb l'objectiu de prevenir el procés neurodegeneratiu (Wong i Cuervo, 2010).

Autofàgia, envelliment, malalties metabòliques i cardioprotecció

A nivell perifèric (múscul esquelètic, fetge i cor), l'autofàgia està implicada en tot un conjunt de funcions, tant a nivell fisiològic com patològic (Figura 12).

En condicions fisiològiques a nivell muscular, l'autofàgia intervé principalment en el manteniment de la massa muscular, en l'homeòstasi de la glucosa i en el metabolisme oxidatiu; a nivell hepàtic, en la gluconeogènesi, en la degradació de material lipídic (lipofàgia) per obtenir energia, en la prevenció de la degeneració hepatocel·lular i en la supressió de tumors hepàtics; i finalment, a nivell cardíac, intervé en la prevenció de la disfunció cardíaca i en l'adaptació hemodinàmica. Així, alteracions del procés d'autofàgia, produiran l'acumulació de proteïnes ubiquitinitzades i d'òrgans danyats (com les mitocòndries i els peroxisomes), contribuint al deteriorament funcional d'aquests teixits que té lloc durant l'envelliment i en diferents patologies (Laplane i Sabatini, 2012; Mizushima i Komatsu, 2011; Rezzani et al., 2012).



	FUNCIONS DE L'AUTOFÀGIA	MALALTIES
	Manteniment de la massa muscular Homeòstasi de la glucosa Metabolisme oxidatiu	Sarcopènia Miopaties Resistència a la insulina
	Gluconeogènesi Degradació de material lipídic (lipofàgia) Prevenió de la degeneració hepatocel·lular Supressió de tumors hepàtics	Resistència a la insulina Hepatomegàlia Hepatitis Cirrosi
	Prevenió de la disfunció cardíaca Adaptació hemodinàmica	Hipertròfia Disfunció cardíaca

Figura 12. Funcions fisiològiques i patològiques de l'autofàgia a nivell perifèric.

En el múscul esquelètic, la inhibició de l'autofàgia estaria relacionada amb l'evolució de la sarcopènia que s'observa durant l'envelliment, i en el desenvolupament de diferents miopaties. I és en el procés d'atròfia muscular que es produeix en la sarcopènia, on intervindria l'activitat transcripcional de FOXO3 (Mammucari et al., 2007; Sandri et al., 2004). En les malalties lisosomals, a més de presentar-se alteracions neurològiques, també s'han observat miopaties i cardiomiopaties. Cal recordar que la sensibilitat a la insulina disminueix amb l'edat, i que aquesta pèrdua s'agreuja amb un balanç energètic positiu causat per l'excés del consum de menjar i/o la inactivitat física. Com la insulina i l'augment dels nivells de nutrients activen a mTOR, és raonable pensar en una reducció del procés d'autofàgia en condicions de resistència a la insulina i d'una ingesta excessiva de menjar (Liu et al., 2009b). D'altra banda, l'activació crònica de la via d'mTOR en el múscul de ratolins obesos i els alimentats amb una dieta rica en greixos, inhibiria la via de la insulina a través de p70S6K1, reduint la captació de glucosa pel múscul i contribuint així encara més a la resistència a la insulina (Khamzina et al., 2005). Per tant, el descens d'autofàgia observat durant l'envelliment estaria implicat en el desenvolupament de la diabetis de tipus II, la qual es caracteritza per resistència a la insulina, contribuint així al desenvolupament de la síndrome metabòlica.

En el fetge, la disminució del procés d'autofàgia que té lloc durant l'envelliment conduiria a l'acumulació de lípids i aquests alhora inhibirien l'autofàgia. Aquest fet es va determinar en ratolins alimentats amb una dieta rica en greixos, observant-se un augment dels nivells de p62 i de proteïnes ubiquitinitzades (Liu et al., 2009b); a més d'un descens de la via de senyalització de la insulina, contribuint així al desenvolupament de resistència a la insulina (Khamzina et al., 2005; Yang et al., 2010). També, reduccions en l'autofàgia serien causa d'hepatomegàlia, hepatitis i cirrosi.

I per últim, a nivell cardíac, el descens de l'autofàgia que es produeix durant l'envelliment, donaria lloc a l'acumulació de proteïnes i orgànuls danyats. Això crearia un cercle viciós, amb una major inhibició de l'autofàgia, donant origen al desenvolupament d'hipertrofia i disfunció cardíaca. Estudis com el de Lee et al. (2008), remarquen el paper de SIRT1 en la regulació de l'autofàgia a nivell cardíac i hepàtic, on estaria implicada també la transcripció de gens autofàgics per FOXO1 (Hariharan et al., 2010).

Recentment, estudis en rosegadors indiquen que l'exercici físic és capaç d'activar l'autofàgia tant en el còrtex cerebral com a nivell perifèric en el múscul esquelètic i en el cor (He et al., 2012a, 2012b); i en humans, en el múscul esquelètic (Jamart et al., 2012).

4.3 La via Wnt

Introducció

La via Wnt regula el desenvolupament del sistema nerviós central i és crucial en la modulació de la plasticitat sinàptica en el cervell adult. A més, a nivell perifèric, està implicada en el desenvolupament, morfogènesi i manteniment de diferents òrgans. Així, alteracions en els nivells o mutacions dels diferents components d'aquesta via s'han associat amb diferents patologies com el càncer, la diabetis, la malaltia cardiovascular i les malalties neurodegeneratives com la malaltia d'Alzheimer (Inestrosa i Toledo, 2008; Li et al., 2005; Gordon i Nusse, 2006; Widelitz, 2005).

Aquesta via comprèn dos grups de vies moleculars: la via no canònica i la via canònica. D'una banda, en la via no canònica, trobem a la via anomenada *planar cell polarity* (PCP), la qual està implicada en l'organització del citoesquelet, i la via depenent de calci, que regula l'adhesió cel·lular. D'altra banda, en la via canònica, la proteïna

β -catenina un cop activada la via, es transloca al nucli i activa l'expressió de gens implicats en la proliferació, diferenciació i supervivència cel·lular. Aquesta visió general de la via Wnt no és tan simple donat que, en cèl·lules de mamífer, trobem 19 tipus de lligands Wnt i 10 receptors Frizzled (Widelitz, 2005). A més, es coneix que un sol tipus de Wnt pot unir-se a diferents receptors Frizzled i viceversa (Janda et al., 2012). A continuació em centraré en els diferents elements que participen en la via canònica, per ser la via estudiada en aquesta tesi doctoral.

Mecanismes moleculars en la via canònica Wnt

L'activació de la via canònica per l'agonista Wnt comportarà la no-degradació de β -catenina en el citoplasma de la cèl·lula i la posterior translocació al nucli activant l'expressió de diferents gens. Malgrat no conèixer amb exactitud els mecanismes moleculars que esdevenen un cop activada la via, el procés que explicarem a continuació es recull en bona part dels articles científics revisats (Clevers i Nusse, 2012; Inestrosa et al., 2012; Li et al., 2005; Maiese et al., 2008; Toledo et al., 2008).

Els nivells citoplasmàtics de β -catenina es troben regulats pel 'complex de destrucció' format per APC (*adenomatous polyposis coli*), Axina (*axis inhibition protein*), CK1 α/δ i GSK-3 α/β . Així, quan no està activada la via, CK1 i GSK-3 fosforilaran de manera seqüencial a β -catenina en residus de serina i treonina. β -catenina fosforilada serà reconeguda per β -TrCP (*β -transducin repeat-containing protein*), -la qual forma part del complex ligasa d'ubiquitina E3-, ubiquitinitzada i degradada finalment pel proteosoma. La proteïna Axina (o Axina1) és necessària per l'assemblatge dels diferents components del 'complex de destrucció'. D'altra banda, la proteïna APC es requereix també pel correcte funcionament d'aquest complex, i alguns autors apunten a que exerciria un paper protector de β -catenina fosforilada a ser desfosforilada, per així ser reconeguda per β -TrCP, ubiquitinitzada i finalment degradada (Su et al., 2008) (Figura 13).

D'altra banda, quan Wnt s'uneix al receptor Frizzled i al co-receptor LRP5/6 (*low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6*), es produeix la fosforilació d'aquest últim, ja sigui per CK1 o GSK-3. Aquesta interacció de Wnt amb Frizzled i LRP5/6 es troba inhibida per diferents elements. Així, tant les proteïnes sFRP (*secreted Frizzled-related proteins*) com WIF (*Wnt inhibitory factor*), s'uneixen a Wnt i impedeixen la seva interacció amb el receptor. També trobem la família de proteïnes Dickkopf, on en mamífers n'hi ha quatre tipus (DKK-1, DKK-2, DKK-3 i DKK-4), sent DKK-1 el membre

fundador i el més estudiat. Aquesta família antagonitza la via quan s'uneix a LRP5/6, impedit així la seva interacció amb Wnt. Un cop fosforilat LRP5/6, es produirà la seva unió a Axina. Altres autors, estableixen que Axina és degradada un cop s'activa la via (Huang et al., 2009; Mao et al., 2001). Dishevelled (Dsh) és una altra família de proteïnes (en mamífers, DVL1, DVL2 i DVL3) que un cop activada la via també interaccionen amb Frizzled, facilitant la unió entre LRP5/6 i Axina. Hi ha autors que proposen que Dvl és capaç d'inhibir a GSK-3 quan s'activa la via (Fukumoto et al., 2001). Aquests fets conduiran a que no es formi el 'complex de destrucció', i per tant, β -catenina no serà fosforilada i degradada pel proteosoma, translocant així al nucli. En el nucli, quan no està activada la via, els factors de transcripció Tcf (*T cell factor*) i Lef (*lymphocyte enhancer factor*), estan associats amb l'inhibidor transcripcional Groucho. En canvi, quan la via s'activa, β -catenina en el nucli desplaça a l'inhibidor Groucho, formant així un complex amb Tcf/Lef i activant finalment l'expressió de diferents gens.

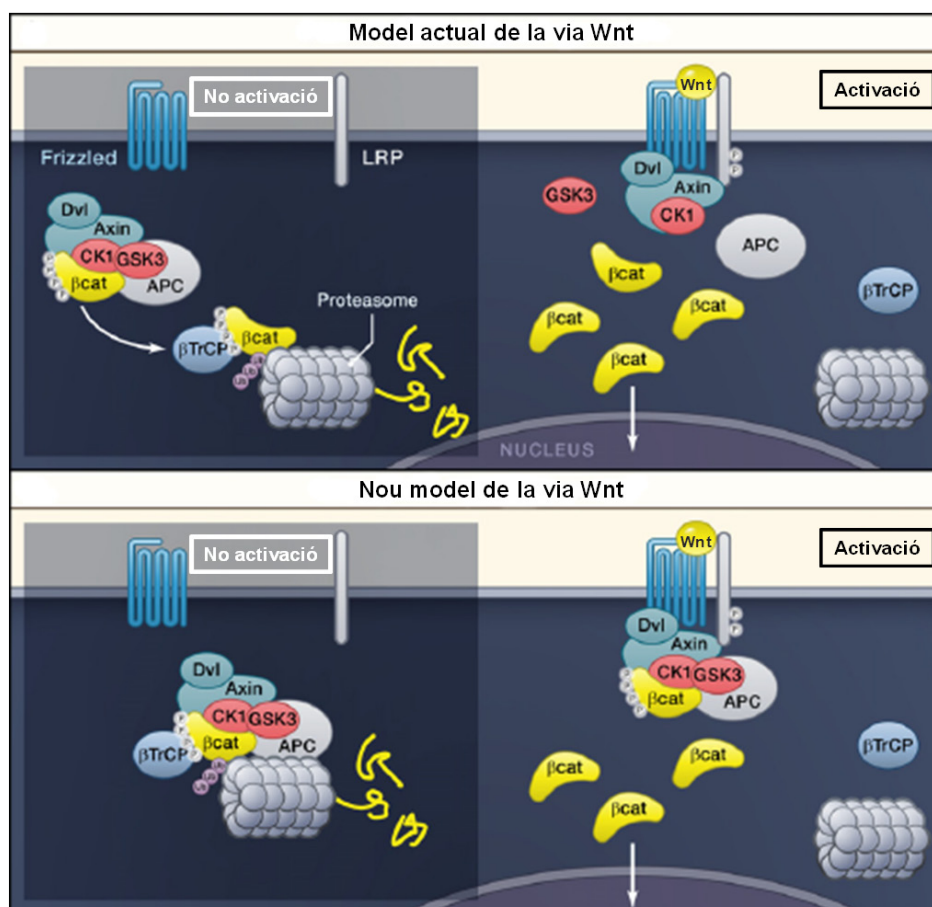


Figura 13. Mecanismes moleculars de la via Wnt: el model actual i el nou model de Liu et al. (2012b) (Modificat de Clevers i Nusse, 2012).

Un estudi recent proposa un nou model d'aquesta via (Li et al., 2012): quan no hi està activada, el 'complex de destrucció' es troba al citoplasma junt amb β -catenina, la qual és fosforilada i ubiquitinitzada per β -TrCP. D'aquesta manera, el proteosoma recicla el complex al degradar a β -catenina. D'altra banda, quan s'activa la via, β -catenina junt amb el 'complex de destrucció', exceptuant a β -TrCP, es desplaçaria cap a la membrana on Axina s'uniria al receptor LRP5/6 fosforilat. Allí continuaria tenint lloc la fosforilació de β -catenina, però no la seva ubiquitinització i degradació. Aquest fet produiria la saturació i la inactivació del 'complex de destrucció', i on la β -catenina sintetitzada *de novo* s'acumularia al citosol, translocant finalment al nucli (Figura 13).

Via canònica Wnt, envelliment i malalties neurodegeneratives

El fet que la via Wnt reguli l'expressió de gens implicats en la supervivència i homeòstasi neuronal suggereix que, alteracions en la seva activació a nivell cerebral, estigueren contribuint al desenvolupament del procés neurodegeneratiu lligat a l'envelliment i a les malalties neurodegeneratives com la malaltia d'Alzheimer (Inestrosa et al., 2012; Kim et al., 2011; Maiese et al., 2008).

Prèviament hem comentat que durant l'envelliment es produeix una disminució del procés de neurogènesi (Lazarov et al., 2010; Miranda et al. 2012) junt amb una pèrdua de sinapsis i d'espines dendrítiques (Bishop et al., 2010; Esiri, 2007), i com aquests fets estarien implicats en el deteriorament del procés d'aprenentatge i memòria. Així, diferents autors assenyalen a la pèrdua de l'activació de la via Wnt en l'envelliment com a responsable d'aquest deteriorament. D'altra banda, diferents estudis han determinat que la seva activació estimula a nivell de l'hipocamp tant el procés de neurogènesi (Lie et al., 2005; Miranda et al. 2012; Okamoto et al., 2011) com el nombre de sinapsis i espines dendrítiques (Gogolla et al., 2009). I és la pràctica d'exercici físic (Okamoto et al., 2011) junt amb l'enriquiment ambiental (Gogolla et al., 2009) els que serien capaços d'estimular aquests processos mitjançant l'augment dels nivells de l'agonista de la via, Wnt3 en el primer cas i Wnt7a/b amb l'enriquiment ambiental, els quals s'ha vist que disminueixen en l'envelliment. També, la modulació per l'exercici de la transcripció de diferents elements de la via Wnt, -entre d'altres gens-, estaria relacionat amb l'augment del procés d'aprenentatge i memòria determinat en el laberint d'aigua (Stranahan et al., 2010).

D'altra banda, l'augment dels nivells de l'antagonista de la via DKK-1 s'ha relacionat amb l'evolució del procés neurodegeneratiu que es produeix en diferents

patologies del sistema nerviós central, com són la malaltia d'Alzheimer, la isquèmia i l'epilèpsia (Caraci et al., 2008). Així, tant en malalts d'Alzheimer (Caricasole et al., 2004) com en diferents models transgènics de la malaltia (Rosi et al., 2010), s'ha determinat un augment de DKK-1 a nivell de l'hipocamp i el còrtex cerebral. Recentment, s'ha relacionat l'increment dels nivells de DKK-1 amb l'envelliment, i com aquest fet produeix una reducció de la neurogènesi a nivell de l'hipocamp junt amb el deteriorament cognitiu associat a l'edat (Seib et al., 2013).

Per tant, l'increment de DKK-1 reduiria l'activació de la via Wnt, activant així a GSK-3 α/β , fet que augmentaria la fosforilació de tau. A més, es reduirien els nivells de β -catenina a nivell nuclear i es desencadenaria la mort neuronal per un mecanisme en què podria estar implicat el descens en els nivells de la proteïna antiapoptòtica BCL-2 i l'augment de BAX, proteïna proapoptòtica (Scali et al., 2006).

Cal destacar el paper de p53, la qual indueix la transcripció de DKK-1 (Wang et al., 2000). Així, p53 s'activa en resposta al dany del DNA, produint la seva reparació o activant el procés d'apoptosi, depenent de l'extensió del dany produït. És per això que DKK-1 es relacionaria amb el dany al DNA i estaria implicat tant en la pèrdua de sinapsis (Purro et al., 2012) com en la mort neuronal (Caricasole et al., 2004; Scali et al., 2006). Així doncs, la inhibició de DKK-1 es consideraria una nova diana farmacològica de diferents alteracions a nivell cerebral (Figura 14).

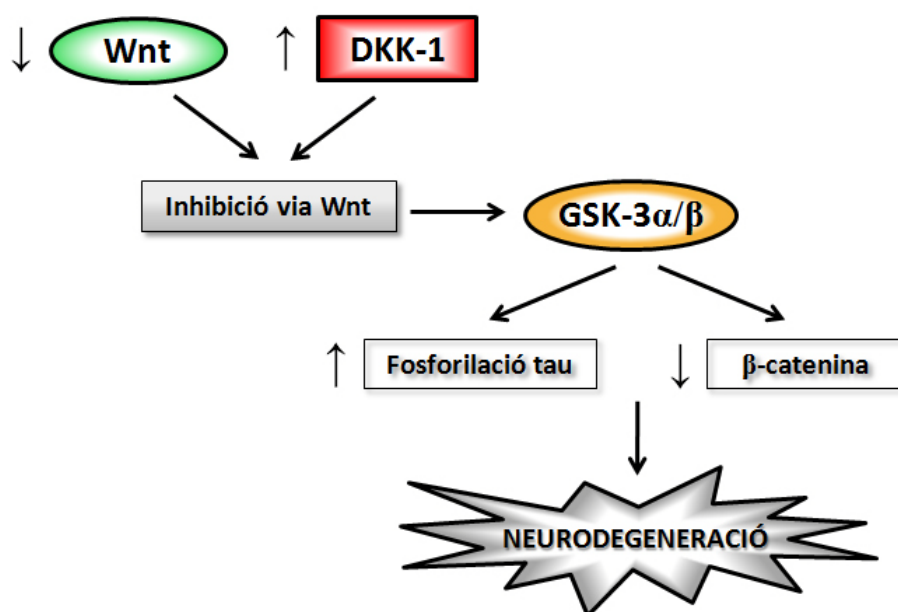


Figura 14. Mecanismes moleculars de la via Wnt relacionats amb la neurodegeneració.

També SIRT1 està implicada en l'activació de la via Wnt. D'una banda, SIRT1 inhibeix l'expressió de DKK-1 (Hussain et al., 2009). A més, augmenta els nivells proteics de Dishevelled (DVL1, DVL2 i DVL3) i és capaç d'interaccionar amb ells (Holloway et al., 2010).

Per tant, l'activació de la via de la Wnt podria ser una bona estratègia terapèutica per fer front al procés neurodegeneratiu lligat a les malalties neurodegeneratives com la malaltia d'Alzheimer, a més de millorar el deteriorament cognitiu associat a l'envelliment. Però s'ha de tenir en compte que, una mala regulació d'aquesta pot conduir al desenvolupament de processos tumorals i cancerosos (Anastas i Moon, 2013).

OBJECTIUS

L'**objectiu general** d'aquesta tesi doctoral ha estat estudiar la via de la sirtuïna 1, el mecanisme d'autofàgia i la via Wnt (via canònica) en l'envelliment, avaluant en rates adultes Sprague-Dawley els possibles efectes moduladors sobre les anteriors vies tant de la pràctica d'exercici físic moderat de llarg termini com de la manipulació dels animals.

Més concretament, els **objectius específics** han estat els següents:

1. Estudiar la via de la sirtuïna 1 i la biogènesi mitocondrial:
 - 1.1 A nivell cerebral: hipocamp i còrtex
 - 1.2 A nivell perifèric: múscul esquelètic, fetge i cor
2. Avaluar diferents paràmetres relacionats amb la neurodegeneració (fosforilació de tau, disminució de proteïnes sinàptiques) a nivell cerebral (hipocamp i còrtex).
3. Examinar el procés d'angiogènesi, el dany oxidatiu i els enzims antioxidants a nivell perifèric (múscul esquelètic, fetge i cor).
4. Estudiar el mecanisme d'autofàgia (macroautofàgia), determinant els nivells de proteïnes ubiquitinitzades i diferents elements que regulen aquest procés:
 - 4.1 A nivell cerebral: hipocamp i còrtex
 - 4.2 A nivell perifèric: múscul esquelètic, fetge i cor
5. Estudiar la via Wnt (via canònica) a nivell cerebral (hipocamp).

RESULTATS

Publicació 1

**LONG-TERM TREADMILL EXERCISE INDUCES
NEUROPROTECTIVE MOLECULAR CHANGES
IN RAT BRAIN**

Bayod S, del Valle J, Canudas AM, Lalanza JF, Sanchez-Roige S,
Camins A, Escorihuela RM, Pallàs M

Journal of applied physiology. 2011;111(5):1380-90

L'exercici físic millora diferents aspectes cognitius en les persones, com la memòria i l'aprenentatge, a més del deteriorament cognitiu associat a l'envelliment. Malgrat que els estudis en rosegadors també confirmen aquests beneficis, els mecanismes moleculars implicats a nivell cerebral no estan del tot clars. Se sap que l'exercici augmenta en plasma i a nivell cerebral els nivells de BDNF i IGF-1, ambdós dos factors neurotròfics implicats en el manteniment de l'activitat neuronal, el procés de plasticitat sinàptica i la neurogènesi. La sirtuïna 1 és un enzim amb activitat desacetilasa, la qual intervé en una àmplia varietat de processos: en el metabolisme, en la supervivència cel·lular i en el procés d'autofàgia. A més, a nivell cerebral se l'ha relacionat amb mecanismes neuroprotectors, i juntament amb AMPK i PGC-1 α , participa en la biogènesi mitocondrial.

Es va estudiar a nivell cerebral (hipocamp i còrtex cerebral) la via de sirtuïna 1 i diferents paràmetres relacionats amb la biogènesi mitocondrial i la neurodegeneració en l'envelliment en rates mascle Sprague-Dawley als 10 mesos de vida. A més, s'ha volgut avaluar els efectes tant de la realització d'exercici físic moderat de llarg termini (36 setmanes des de les 5 setmanes de vida, 4-5 dies a la setmana, 30 minuts al dia) com també de la simple manipulació dels animals sobre aquesta via i processos.

L'exercici físic va revertir la davallada dels nivells proteics d'IGF-1 en sèrum observada amb l'edat. A nivell cerebral, no va modificar els nivells de NAMPT, però va augmentar els nivells i activitat de SIRT1 fins a valors semblants al grup de rates joves, observant-se una disminució de l'acetilació de p53. L'exercici físic també va incrementar els nivells d'AMPK fosforilada, i per tant la seva activació, juntament amb els nivells de PGC-1 α (sols en còrtex), observant-se un augment de la biogènesi mitocondrial. Així, es va determinar un increment de diferents complexos de la cadena respiratòria mitocondrial (sistema OXPHOS) i un major marcatge de la proteïna mitocondrial prohibitina (aquesta a nivell del gir dentat). A nivell de l'hipocamp, l'exercici va revertir l'activació de GSK-3 β junt amb l'augment dels nivells de tau fosforilada, determinats ambdós en l'envelliment. A més, va produir un increment dels nivells de sinaptofisina (també en còrtex).

Per tant, l'exercici físic desencadena tot un conjunt d'efectes beneficiosos a nivell cerebral, ja que és capaç d'activar la via de SIRT1, augmentar la biogènesi mitocondrial i millorar el procés neurodegeneratiu. Cal dir però, que tots aquests efectes no van ser exclusius de l'exercici, ja que alguns també es van determinar en el grup d'animals que es van manipular, això sí, de manera menys intensa en bona part dels casos.

Long-term treadmill exercise induces neuroprotective molecular changes in rat brain

S. Bayod,^{1,2} J. del Valle,^{1,2} A. M. Canudas,^{1,2} J. F. Lalanza,³ S. Sanchez-Roige,³ A. Camins,^{1,2} R. M. Escorihuela,³ and M. Pallàs^{1,2}

¹Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, Barcelona; ²Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Barcelona; and ³Departament de Psiquiatria i Medicina Legal, Institut de Neurociències, Fac de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Submitted 7 April 2011; accepted in final form 2 August 2011

Bayod S, del Valle J, Canudas AM, Lalanza JF, Sanchez-Roige S, Camins A, Escorihuela RM, Pallàs M. Long-term treadmill exercise induces neuroprotective molecular changes in rat brain. *J Appl Physiol* 111: 1380–1390, 2011. First published August 4, 2011; doi:10.1152/jappphysiol.00425.2011.—Exercise enhances general health. However, its effects on neurodegeneration are controversial, and the molecular pathways in the brain involved in this enhancement are poorly understood. Here, we examined the effect of long-term moderate treadmill training on adult male rat cortex and hippocampus to identify the cellular mechanisms behind the effects of exercise. We compared three animal groups: exercised (30 min/day, 12 m/min, 5 days/wk, 36 wk), handled but nonexercised (treadmill handling procedure, 0 m/min), and sedentary (nonhandled and nonexercised). Moderate long-term exercise induced an increase in IGF-1 levels and also in energy parameters, such as PGC-1 α and the OXPHOS system. Moreover, the sirtuin 1 pathway was activated in both the exercised and nonexercised groups but not in sedentary rats. This induction could be a consequence of exercise as well as the handling procedure. To determine whether the long-term moderate treadmill training had neuroprotective effects, we studied tau hyperphosphorylation and GSK3 β activation. Our results showed reduced levels of phospho-tau and GSK3 β activation mainly in the hippocampus of the exercised animals. In conclusion, in our rodent model, exercise improved several major brain parameters, especially in the hippocampus. These improvements induced the upregulation of sirtuin 1, a protein that extends life, the stimulation of mitochondrial biogenesis, the activation of AMPK, and the prevention of signs of neurodegeneration. These findings are consistent with other reports showing that physical exercise has positive effects on hormones.

moderate exercise; forced treadmill; neurodegeneration; sirtuin 1; mitochondrial biogenesis; tau

THE BENEFICIAL EFFECTS OF exercise in humans have been most clearly demonstrated in aging populations, where sustained exercise enhances learning and memory, improves executive function, and counteracts age-related and disease-related atrophy in brain areas that are crucial for higher cognitive processes (6, 11). Consistent with research in humans, rodent studies show that exercise facilitates acquisition and retention in young and aged animals performing various hippocampus-dependent tasks including the Morris water maze (35, 37), the radial arm maze (30), passive avoidance (27), and the object recognition test (24).

Several molecular systems, including neurotrophic factors, may contribute to the beneficial effects of the exercise on the brain. For example, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) supports the survival and growth of many neuronal subtypes, including glutamatergic neurons (5, 8). This effect is sustained several weeks after exercise. BDNF increases neural plasticity within the hippocampus, resulting in improved learning and memory (10).

Moreover IGF-1, a growth factor structurally related to pro-insulin, is a potent survival factor for neurons and oligodendrocytes. Furthermore, IGF-1 participates in neuronal growth and differentiation in the brain. In addition, IGF-1 may be an upstream mediator of BDNF gene regulation, neurogenesis, and the sirtuin 1 pathway, and might thus contribute to the protection of the brain against injury (22). Peripheral IGF-1 initiates growth-factor cascades in the brain that can alter plasticity mechanisms and can also induce neuroprotective pathways (10, 21).

Sirtuin 1, a NAD⁺-dependent deacetylase, is a potential downstream target that mediates the neuroprotective effects of IGF-1 (18). Evidence indicates that the sirtuin 1 pathway regulates cell survival and rescues proteins in several neurodegenerative conditions (12). In mammals, sirtuin 1 is located in the nucleus, and it regulates p53, NF- κ B, the FoxO family, PGC-1 α , and other transcription factors via deacetylation. Thus sirtuin affects crucial pathways involved in cellular stress resistance and oxidative metabolism (27, 28, 30). Recently, it was reported that sirtuin 1 mediates AMP-activated protein kinase (AMPK) action on PGC-1 α transcriptional activity, the expression of genes involved in mitochondrial and lipid metabolism, and oxygen consumption (2). AMPK is a metabolic sensor that is transiently activated in muscle by acute exercise (3). Interdependent regulation of sirtuin 1 and AMPK may provide a precise mechanism to influence energy homeostasis. It has also been proposed that sirtuin 1 and PGC-1 α expression are independently regulated; however, although sirtuin 1 may be involved in mitochondrial biogenesis, it does not correlate closely with mitochondrial protein expression (4).

In addition, the expression of nicotinamide phosphoribosyl transferase (NAMPT), a rate-limiting step in the conversion of nicotinamide to NAD⁺, is found to be higher in rat muscle after exercise. All the data available indicate that sirtuin 1 is responsive to exercise and that this pathway modulates the adaptive mechanism triggered by exercise (17).

The dependence of cellular NAD⁺ links sirtuin 1 to the metabolic state of the cell (18). This observation is particularly relevant for neuronal function as cognitive impair-

Address for reprint requests and other correspondence: M. Pallàs, Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, E-08028 Barcelona, Spain (e-mail: pallas@ub.edu).

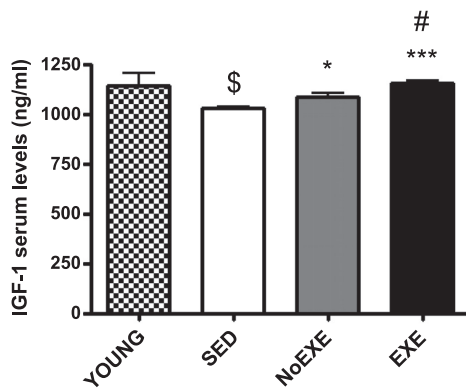


Fig. 1. IGF-1 serum levels in young (YOUNG), exercised (EXE), control (NoEXE), and sedentary (SED) animals. Data represent means \pm SD of 6 rats. \$ P < 0.05 vs. YOUNG; * P < 0.05; *** P < 0.001 vs. SED; # P < 0.05 vs. NoEXE.

ment during aging and in neurodegenerative diseases occurs in the presence of mitochondrial disturbances. Indeed, sirtuin 1 activation has been postulated as a neuroprotective strategy. In this regard, new data indicate that this deacetylase interacts with components of the autophagy machinery, and so this new mechanism would explain the contribution of sirtuin 1 to cell survival (19, 28) and provide a link between the function of this deacetylase and the overall cellular response to limited nutrients.

Here, we examine the effect of long-term treadmill exercise on sirtuin 1 pathway activity and on the molecular and cellular processes associated with bioenergetics and neurodegeneration in the rat cortex and hippocampus.

METHODS

Animals and general procedure. Twenty-nine male Sprague-Dawley rats aged 5 wk at the beginning of the experiment were used. All rats were obtained from the Servei d'Estabulari (Universitat Autònoma de Barcelona). Animals were housed two per cage and had free access to food and water. They were maintained under a 12-h light-dark cycle (lights on at 0800) and standard temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Rats were semi-randomly distributed into three experimental groups, balancing the total body weight: exercised (EXE; $n = 12$, 95.49 ± 3.38 g), control (NoEXE; $n = 9$, 102.24 ± 5.2 g), and sedentary (SED; $n = 8$, 95.75 ± 4.81 g) groups. At the end of the experiment, blood was obtained by intracardiac injection. The animals were then killed by decapitation between 0900 h and 1200. Eight-week-old male rats ($n = 6$) were also killed on the same day to include young controls in the analysis. The brain was immediately removed and dissected into cortex and hippocampus. Brain tissues were frozen in powdered dry ice and maintained at -80°C until use. In addition, four brains from each group were processed for immunohistochemical analysis. Briefly, the tissue was fixed in methacarn and processed for paraffin-embedded immunohistochemistry. The experimental protocol was approved by the *Ethics Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona* and complied with "Principles of laboratory animal care" and the European Communities Council Directive (86/609/EEC).

Exercise regime. A treadmill consisting of three parallel runways (45 cm long, 11 cm wide, and 12 cm deep) was used. The apparatus was placed at an inclination of 0° in the cage. Exercise sessions were conducted between 1330 and 1630, 4–5 days/wk for 36 wk. Neither electrical shock nor physical prodding were used to force training. On the first day, the rats were placed in the treadmill for 30 min without running to become habituated to the apparatus and to diminish exercise-induced stress during the following days. EXE and NoEXE groups were weighed every day before the 30-min treadmill session. For the EXE group, the treadmill started at a speed of 4.2 m/min and increased progressively by 1 m/min every 30 s to a speed of 12 m/min (which was reached between minutes 3 and 12). NoEXE rats were

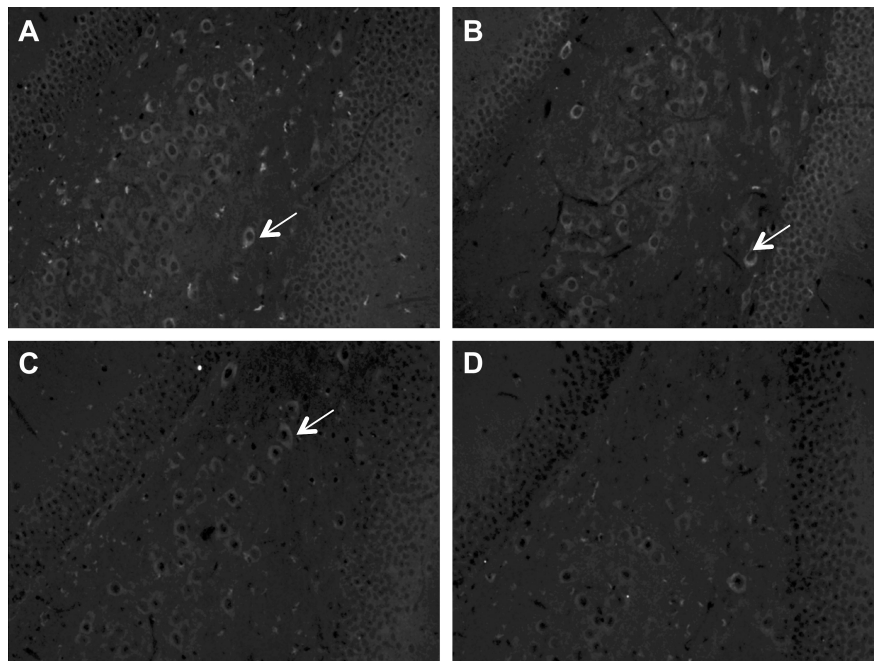


Fig. 2. Representative images of dentate gyrus regions stained with prohibitin ($\times 20$ magnification) from YOUNG (A), EXE (B), NoEXE (C), and SED (D) animals. Less and weaker mitochondria appear in the dentate gyrus of the SED animals (D) compared with the other groups (A–C).

placed individually on another treadmill (0 m/s) for the same number of sessions and the same duration as the EXE rats. Thus control and exercised rats were handled in the same manner and spent the same amount of time out of the home cage. The SED group was handled once a week for cage cleaning and tail marking. Two rats were excluded from the experiment because they showed signs of distress and did not run.

Brain isolation and Western blot analysis. Tissues samples were homogenized in lysis buffer containing phosphatase and protease inhibitors (Cocktail II, Sigma). The protein concentration in tissue samples was determined by the Bradford method. Protein (20 μ g) was separated by SDS-PAGE (5–15%) and transferred to PVDF membranes (Millipore). The membranes were blocked in 5% nonfat milk in TBS containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) for 1 h at room temperature, followed by an overnight incubation at 4°C with antibodies diluted in TBS-T and 5% BSA: sirtuin 1 (1:1,000; Millipore), p53 (1:1,000; Cell Signaling), acetyl p53 (1:500; Abcam), NAMPT (1:1,000; Abcam), AMPK α (1:500; Cell Signaling), p-AMPK α Thr¹⁷² (1:500; Cell Signaling), tau (1:5,000; Biosource), p-tau Ser³⁹⁶ (1:4,000; Biosource), p-GSK3 β Tyr²¹⁶ (1:1,000; Upstate),

GSK3 β (1:1,000; Cell Signaling), PGC-1 α (1:500; Cayman Chemical), OXPHOS cocktail (1:500; MitoSciences), porin (1:500; MitoSciences), synaptophysin (1:500; Abcam), GAPDH (1:2,000; Millipore), and β -actin (1:20,000; Sigma). Membranes were then washed and incubated with secondary antibodies for 1 h at room temperature. Protein bands were visualized using a chemiluminescence detection kit (Amersham Biosciences). Band intensities were quantified by densitometric analysis, and values were normalized to β -actin or GAPDH expression.

Immunohistochemistry and image acquisition. Tissue samples were deparaffinized in xylene and hydrated through a descending ethanol gradient. Afterward, the brain sections were rehydrated with PBS for 5 min before being blocked and permeabilized with PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) and 0.1% Triton-X-100 (Sigma-Aldrich) for 20 min. They were then washed twice for 5 min in PBS and incubated with the primary antibodies (see below) overnight at 4°C. After an additional wash, tissues were incubated with secondary antibodies (see below) for 1 h at room temperature. Tissues were washed again, and nuclear staining was performed by incubating slides in Hoechst (H-33258, Fluka, Madrid, Spain) reagent

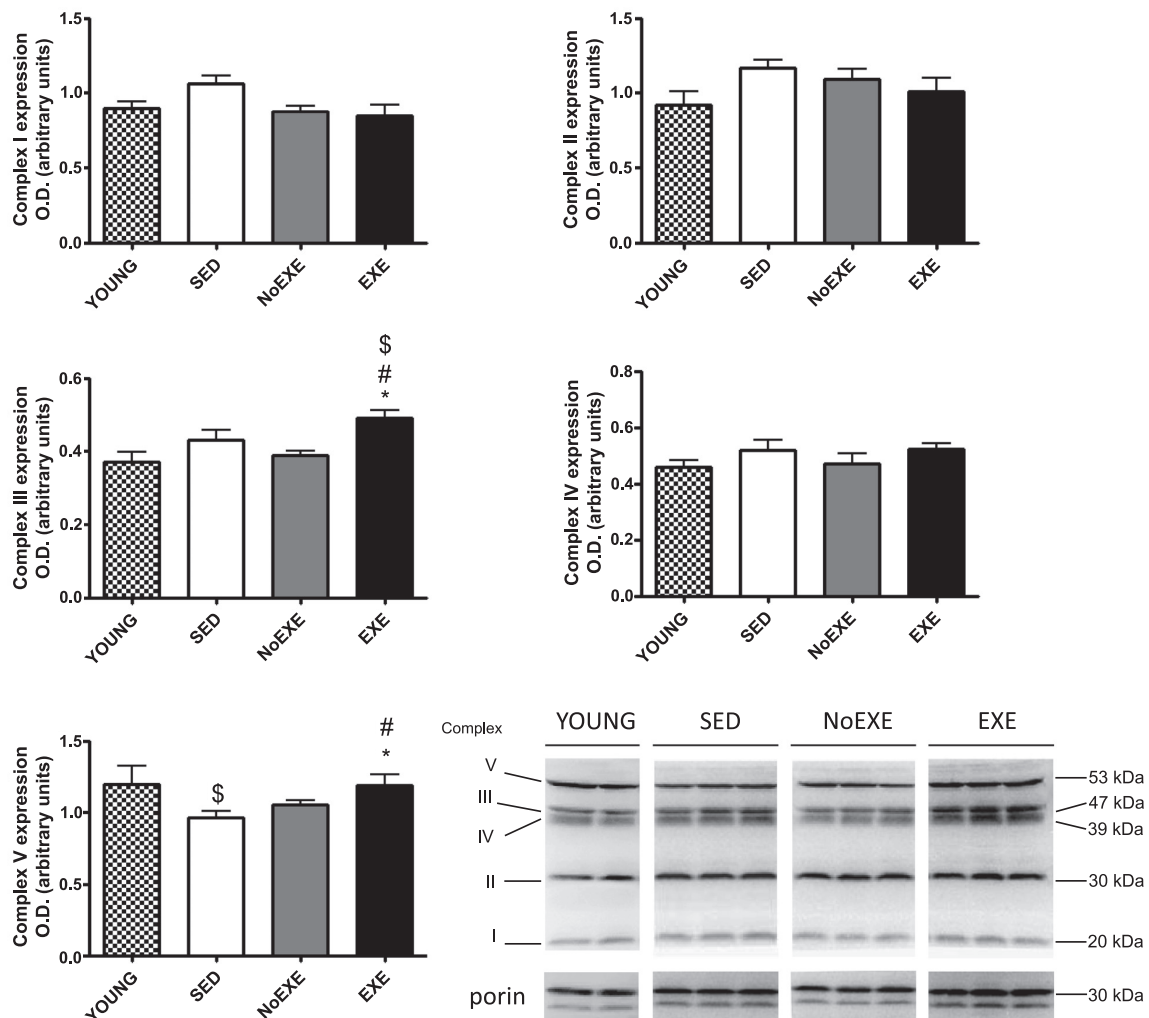


Fig. 3. Representative Western blots and adjusted values for the mitochondrial electron transport chain complexes in cortex from YOUNG, EXE, NoEXE, and SED animals. Images show representative Western blot and bar graph obtained from semi-quantitative image analysis, as described in MATERIALS AND METHODS. Data represent means \pm SD of 6–8 rats. $P < 0.05$ vs. YOUNG; $*P < 0.05$ vs. SED; $\#P < 0.05$ vs. NoEXE.

at 2 $\mu\text{g/ml}$ in PBS for 10 min at room temperature in the dark. Finally, slides were washed, mounted using fluoromount G, allowed to dry overnight at room temperature, and stored at 4°C in the dark. Immunostained controls were performed by incubation with PBS instead of the primary antibody or instead of both antibodies. Rabbit polyclonal anti-prohibitin (1:50; Santa Cruz) was used as a mitochondrial marker. The AlexaFluor 555 donkey anti-rabbit IgG (1:250; Invitrogen, Carlsbad, CA) was used as secondary antibody. Images were taken with a fluorescence laser microscope (BX41, Olympus, Germany) at $\times 20$ magnification. All images were acquired with the same microscope, laser, and software settings.

IGF-1 determination. Serum was obtained from heparinized blood samples centrifuged (3,500 rpm, 10 min, room temperature) immediately after intracardiac extraction. Serum samples were maintained at -80°C until use. Serum IGF-1 was determined by ELISA kit (Mouse/Rat Insulin-like Growth Factor-I; Mediatech, IGF-I EIA E25) following the manufacturer's recommendations.

Data analysis. Data are expressed as means \pm SD from 6–8 samples. In all cases, data were analyzed by ANOVA followed by post hoc Tukey-Kramer multiple-comparison tests. P values of <0.05 were considered significant.

RESULTS

IGF-1 plasma levels and body weight. At the end of the experimental protocol, none of the experimental groups registered significant changes in weight (data not shown).

IGF-1 serum levels were significantly higher in YOUNG than in SED animals (Fig. 1). Levels of IGF-1 were higher in EXE than in NoEXE and SED rats (Fig. 1). A significant increase was also detected in the NoEXE group compared with SED animals. In both groups (EXE and NoEXE), IGF-1 levels reached levels observed in YOUNG rats.

Bioenergetic parameters. Immunohistochemistry with prohibitin as a mitochondrial marker revealed a weaker presence of mitochondria in the dentate gyrus of the SED animals than in the other groups (Fig. 2). Analysis of the OXPHOS system demonstrated that some mitochondrial complexes were increased in the hippocampus and cortex of EXE animals. Significant increases were found in complex III and V in the cortex of these animals (Fig. 3), whereas increases in complexes I, IV, and V

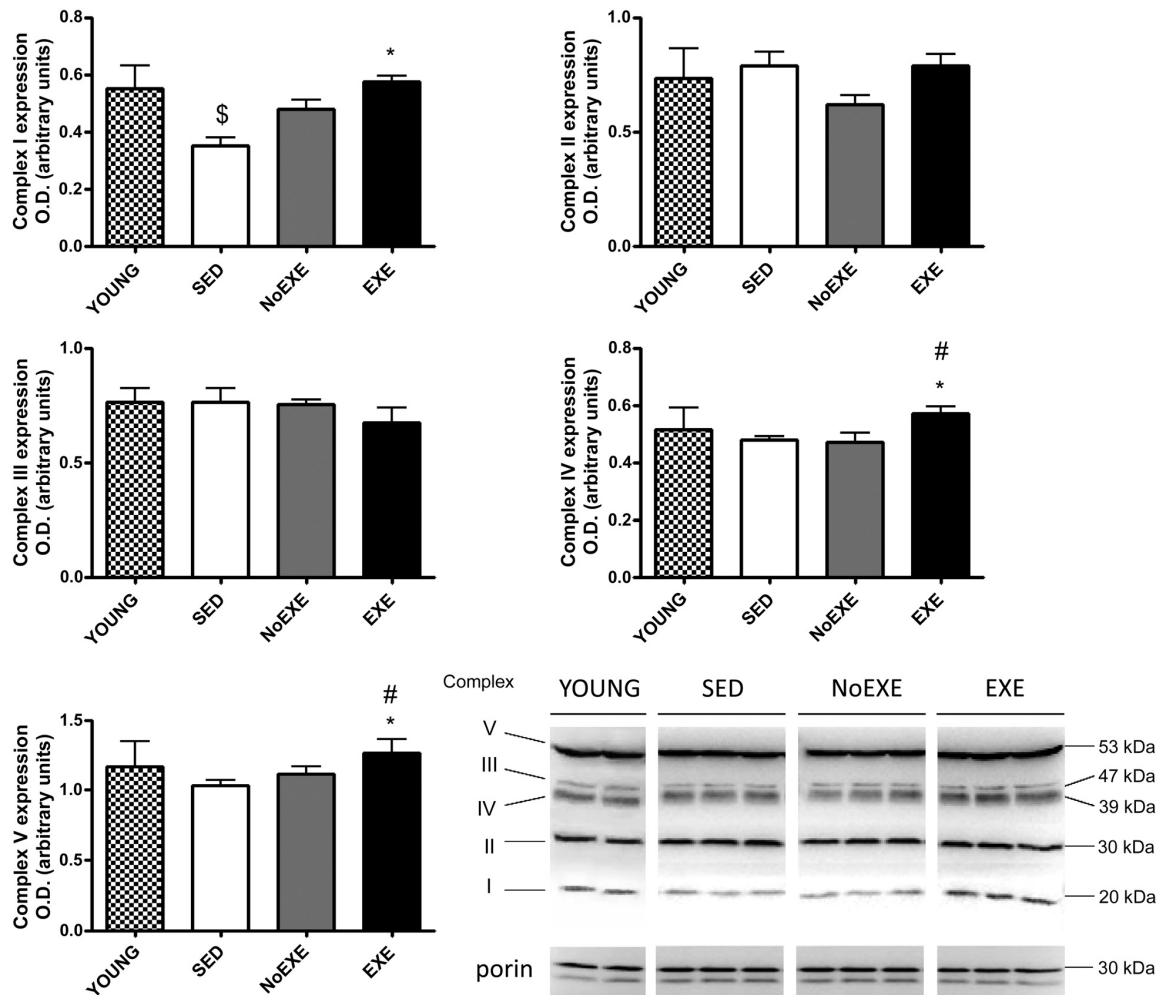


Fig. 4. Representative Western blots and adjusted values for the mitochondrial electron transport chain complexes in hippocampus from YOUNG, EXE, NoEXE, and SED animals. Images show representative Western blots and bar graph obtained from semi-quantitative image analysis as described in MATERIALS AND METHODS. Data represent means \pm SD of 6–8 rats. $^{\$}P < 0.05$ vs. YOUNG; $^*P < 0.05$ vs. SED; $^{\#}P < 0.05$ vs. NoEXE.

were found in hippocampus of EXE rats compared with SED animals (Fig. 4). No significant differences were found between NoEXE and SED animals in any cerebral area studied. Moreover, AMPK activation was detected both in cortex and hippocampus in

the EXE group, as shown by greater levels in Thr¹⁷² phosphorylation compared with SED and NoEXE animals. No differences in AMPK activation were observed between SED and NoEXE (Fig. 5, A and B).

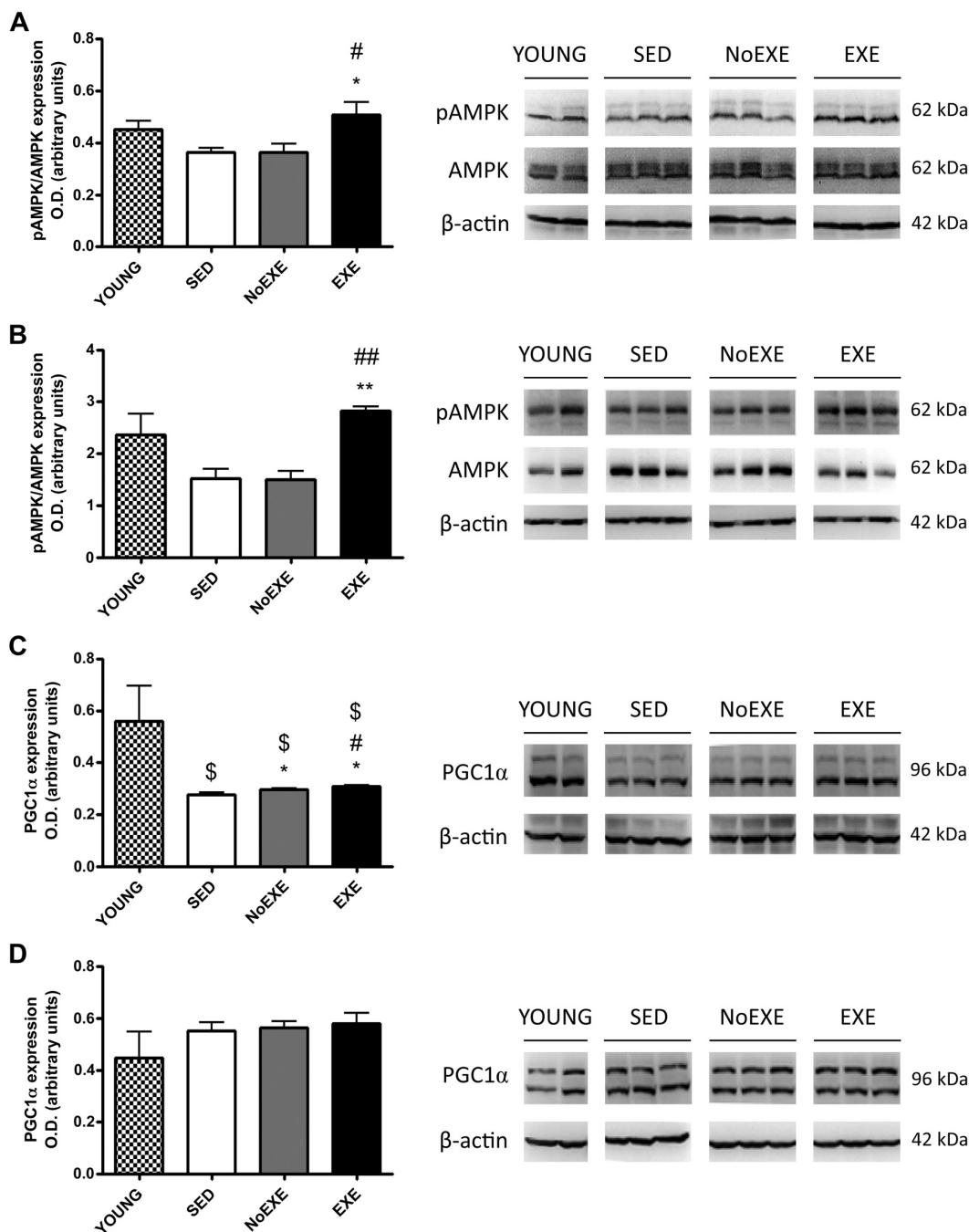


Fig. 5. Changes in AMPK phosphorylation (p-AMPKα Thr¹⁷²) were detected in the cortex (A) and hippocampus (B) of EXE, but not NoEXE or SED animals. Higher levels were also found in EXE animals for AMPK phosphorylation than for NoEXE animals both in cortex (A) and hippocampus (B). Cortex levels of PGC-1α were higher in EXE and NoEXE than in SED animals (C), and no changes were found in hippocampus (D). Cortex levels of PGC-1α were also higher in the EXE compared with the NoEXE group. Images show representative Western blots and bar graph obtained from semi-quantitative image analysis as described in MATERIALS AND METHODS. Data represent means \pm SD of 6–8 rats. \$*P* < 0.05 vs. YOUNG; **P* < 0.05; ***P* < 0.01 vs. SED; #*P* < 0.05; ##*P* < 0.01 vs. NoEXE.

Regional differences were found for PGC-1 α . Although no significant differences were detected in the hippocampus (Fig. 5D), an increase in total protein was found in the cortex (Fig. 5C) of the EXE group compared with NoEXE and SED animals. Also, significant differences in PGC-1 α between NoEXE and SED were found in the cortex (Fig. 5C).

Sirtuin 1 pathway. Immunodetection of sirtuin 1 in the cortex and hippocampus of EXE and NoEXE animals showed a signif-

icant increase compared with SED rats (Fig. 6, A and C). These results correlated with a significant decrease in p53 acetylation in EXE and NoEXE animals in the same areas. Furthermore, a higher sirtuin 1 expression and a lower p53 acetylation were found to be significant between the cortex of EXE and NoEXE animals (Fig. 6, A and B). Given the relationship between the sirtuin 1 pathway and aging, we also examined the sirtuin 1 and acetylated p53 in a group of

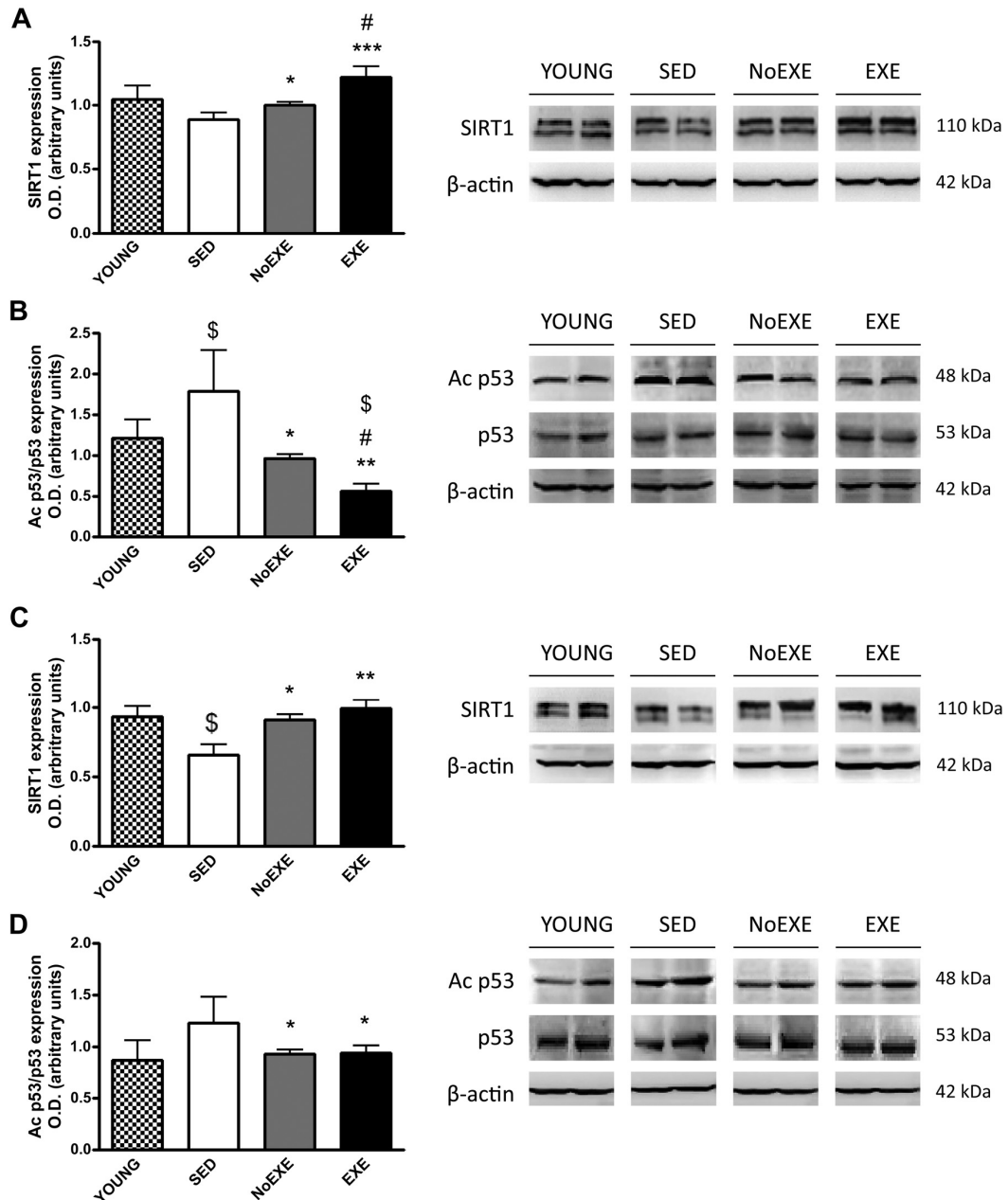


Fig. 6. Sirtuin 1 levels and its acetylated substrate p53 in YOUNG, EXE, NoEXE, and SED animals. Sirtuin 1 levels were higher in EXE and NoEXE than in SED, and in a parallel fashion Ac-p53 expression was lower in these groups compared with SED. Images show representative Western blots and bar graph obtained from semi-quantitative image analysis of cortex (A and B) and hippocampus (C and D) as described in MATERIALS AND METHODS. Data represent means \pm SD of 6–8 rats. \$ P < 0.05 vs. YOUNG; * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001 vs. SED; # P < 0.05 vs. NoEXE.

young (8-wk-old) rats. Significant differences in the expression of sirtuin 1 in the hippocampus and p53 acetylation levels in the cortex were detected between young and SED animals, thus corroborating the contributing role of the sirtuin 1 pathway to aging (Fig. 6, *B* and *C*). However, although sirtuin 1 activity is dependent on the NAD^+ -to-NADP ratio, we did not detect changes in NAMPT levels (a key regulator of the NAD^+ production) in any experimental groups (Fig. 7).

Neuroprotective role of treadmill exercise in rats. We studied the levels of tau hyperphosphorylation and GSK3 β as measures of the induction of neuroprotection after exercise. No changes were detected in tau phosphorylation or GSK3 β activity in the cortex of EXE or NoEXE animals (Fig. 8, *A* and *C*). However, in the hippocampus, the degree of tau phosphorylation (Ser³⁹⁶) was lower in EXE animals than in the NoEXE and SED groups (Fig. 8*B*). In addition, GSK3 β activation was higher in the SED group compared with the EXE and NoEXE animals, as shown by the increase in the phosphorylated form of GSK3 in Tyr²¹⁶ (Fig. 8*D*). Moreover, these two proteins were also measured in the cortex and hippocampus of the young animals. Lower levels in tau phosphorylation were found in young animals compared with adult animals with the exception of the hippocampus of the EXE group, where no significant differences were reached (Fig. 8, *A* and *B*). On the other hand, young rats showed less GSK3 β activation (Fig. 8, *C* and *D*) in the two cerebral areas studied.

To finish with, we also measured the levels of synaptophysin, a marker of neurotransmission. EXE and NoEXE rats showed higher synaptophysin expression in the cortex than

SED animals. Conversely, a significant increase in this parameter was observed only in the hippocampus of EXE rats (Fig. 9). This observation explains the differential effect of exercise in this cerebral area.

DISCUSSION

Clinical literature has long recognized that exercise enhances overall health and brain function (16, 34). Recent studies reinforce the hypothesis that exercise benefits brain function by inducing BDNF and other molecules that mediate improvements in neuronal structure, facilitate synaptic transmission, and offer neuroprotective actions in several physiological (aging) and pathological (neurodegenerative diseases) conditions (22, 33). One of the most promising pathways implicated in enhanced neuronal conditions is sirtuin 1 (31). In this regard, few studies have addressed the expression and activity of this molecule or that of sirtuin 6, which are related to forced exercise (17).

IGF-1 increases in plasma and brain after exercise, and at least part of the increase in the brain reflects increased transport from the periphery across the blood-brain barrier. Peripheral IGF-1 initiates growth-factor cascades in the brain that can alter on-going plasticity mechanisms or neuroprotective pathways (20, 33). In our experimental conditions, the EXE group showed higher serum IGF-1 levels than NoEXE and SED animals, thereby indicating a positive effect of long-term moderate exercise. Notably, exercise alters tissue metabolism, resulting in reduced fat accumulation and increased insulin

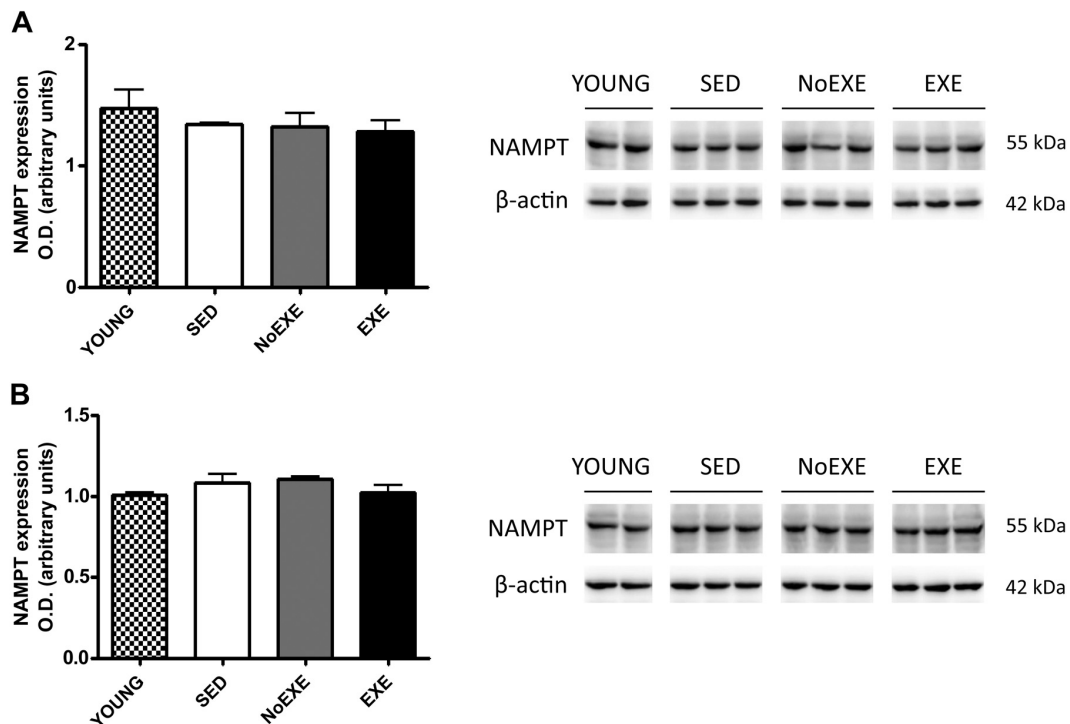


Fig. 7. No changes were detected in the levels of the NAD^+ biosynthetic enzyme NAMPT in YOUNG, EXE, NoEXE, or SED animals in the cortex (*A*) or hippocampus (*B*). Bars are means \pm SD for 6–8 animals per group.

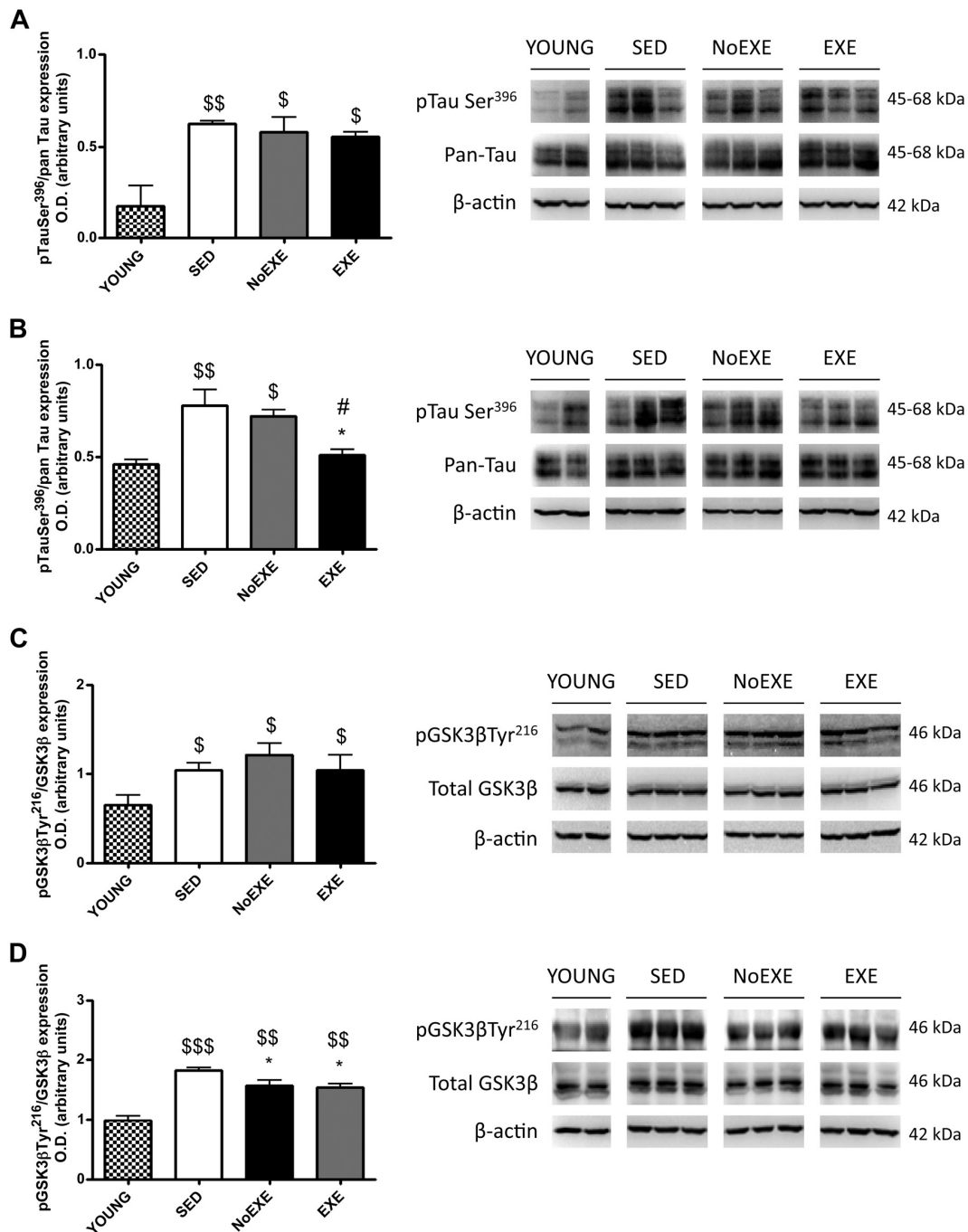


Fig. 8. The degree of Tau phosphorylation in Ser³⁹⁶ was not modified in SED, EXE, or NoEXE animals in the cortex (A); concomitantly, no changes in GSK3β activation or Tyr²¹⁶ phosphorylation were detected (C). A significant decrease in p-Tau Ser³⁹⁶ was detected in EXE animals in the hippocampus (B) compared with SED and NoEXE animals. GSK3β (phosphorylation in Tyr²¹⁶) levels were also higher in the hippocampus of SED rats (D). Levels of p-Tau Ser³⁹⁶ and p-GSK3β Tyr²¹⁶ in the young group (YOUNG) were lower than in the other three groups in the cortex and hippocampus (A–D). Representative Western blots and graphical illustration of results from densitometry analysis are shown. Values are means \pm SD for 6 animals per group. \$ P < 0.05; \$\$ P < 0.01; \$\$\$ P < 0.001 vs. YOUNG, * P < 0.05 vs. SED; # P < 0.05 vs. NoEXE.

sensitivity. This action thus contributes to delaying the onset of age-related diseases (13).

In skeletal muscle, exercise promotes mitochondrial biogenesis and alterations in energy metabolism through increases in

PGC-1 α expression (14). Thus mitochondrial biogenesis is a possible target of the molecular changes induced by exercise (9, 15). The long-term moderate exercise in this study altered the mitochondrial pattern in the brain; SED animals presented

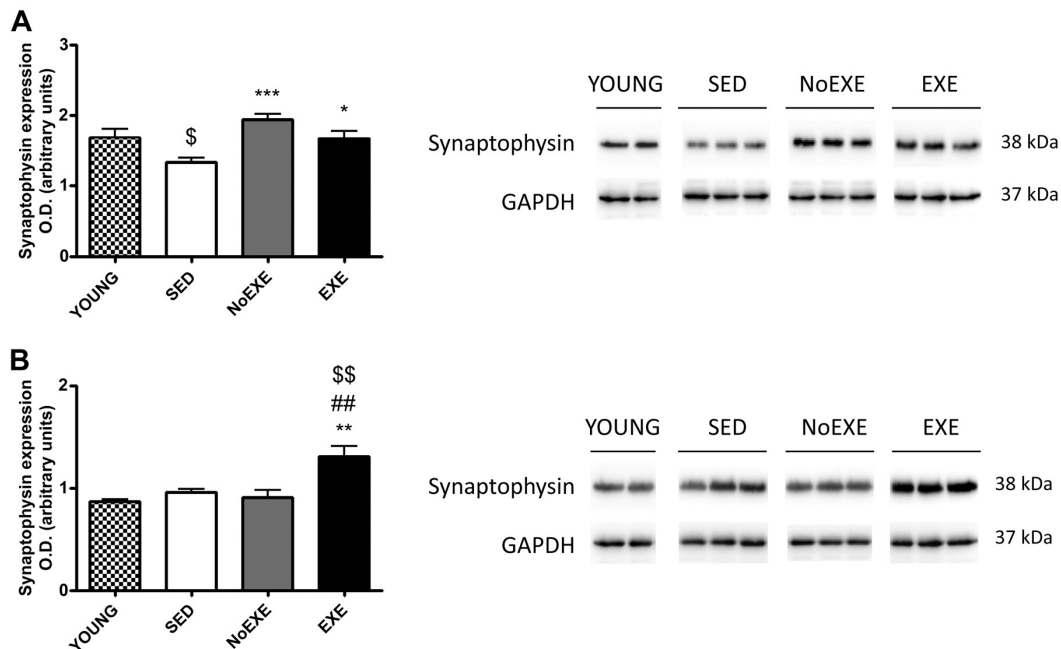


Fig. 9. Synaptophysin expression in the cortex (A) and hippocampus (B). The expression of synaptophysin was significantly higher in the cortex of EXE and NoEXE animals than in SED rats. However, in the hippocampus, higher levels appeared only in EXE animals. Images show representative Western blots and bar graph obtained from semi-quantitative image analysis, as described in MATERIALS AND METHODS. Data represent means \pm SD of 6–8 rats. \$ P < 0.05 vs. YOUNG; * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001 vs. SED; ## P < 0.01 vs. NoEXE.

less immunoreactivity for prohibitin (a mitochondrial marker) in the dentate gyrus, a zone of the brain characterized by a high rate of neurogenesis. Consistently, increases in complex V in the cortex and hippocampus were found, whereas complex III in the cortex and complexes I and IV in the hippocampus were also higher in EXE rats than in the other two groups. Moreover, these results are consistent with those of others studies in rodents that described an increase in mitochondrial biogenesis in other tissues after exercise (14, 15). Accordingly, we found that activation of AMPK was higher in the EXE rats than in the other two groups.

Endurance training and in vivo chronic contractile activity are paradigms that dramatically increase mitochondrial biogenesis, mediated in part through the elevation in PGC-1 α expression and activation in muscle and heart (38). We detected an increase in PGC-1 α in the cortex of EXE rats. Suwa and coworkers (31) were the first to demonstrate that skeletal muscle sirtuin 1 protein expression increases in rats in response to exercise. They found that sirtuin 1 and PGC-1 protein levels were higher and correlated positively with mitochondrial components (31). Furthermore, Canto and coworkers (2) demonstrated that the activity of PGC-1 α is finely tuned by AMPK and sirtuin 1, as a mechanism for energy homeostasis under long-term physical exercise (18).

It has recently been proposed that sirtuin 1 expression is more closely related to mitochondrial biogenesis than PGC-1 α (4). We found that long-term moderate exercise, comparable to rapid walking or slow running in humans, induced a significant increase in sirtuin 1 expression in the rat cortex and hippocampus compared with the SED group. The differences were also significant compared with the cortex of NoEXE group, thus

indicating that part of the effect observed on sirtuin 1 expression was due mainly to moderate running exercise per se and not only to the handling procedure involved in the treadmill training protocol. The increase in sirtuin 1 expression correlated with a reduction in the acetylated form of p53, one of the most important substrates of this deacetylase. Aging is one of the physiological processes associated with sirtuin 1. We also studied the activation of the sirtuin 1 pathway in young animals. As expected, significant differences were found for sirtuin 1 and acetylated p53 levels when compared with adult SED animals.

Some authors reported higher levels of NAMPT and the limiting enzyme of NAD $^{+}$ processing in the skeletal muscle of sedentary subjects after 3 wk of exercise training, and they also described that NAMPT correlated with mitochondrial content (7). Conversely, we found no increase in the NAD $^{+}$ -to-NADP ratio as a result of higher sirtuin 1 activity since no changes in the limiting enzyme of NAD $^{+}$ processing (NAMPT) were found in our experimental conditions. However, the increase in AMPK activation, which acts as a sensor of energy requirements and in sirtuin 1 activity, was accompanied by enhanced deacetylase activity in our experimental conditions.

Globally, these results show that exercise increases energy availability in brain and activates a prosurvival pathway, namely sirtuin 1 (23). Thus an improvement in neuronal function and neuroprotection can be deduced, because neuroprotection is also linked to energy disposal. We examined the degree of tau phosphorylation and GSK3 β activation as indicators of the prevention of neurodegeneration since hyperphosphorylation of tau is responsible for several degenerative con-

ditions in the brain (25). Long-term moderate exercise prevented tau hyperphosphorylation and rendered GSK3 β inactive, two processes observed in the SED animals. The preventive effect of long-term moderate exercise on these parameters was significant in the hippocampus, the main area of the brain associated with learning and memory, and were more similar to the profile of young animals. Moreover, exercise also induced an increase in synaptophysin, especially in the hippocampus, in agreement with Dietrich et al. (9), who described that exercise induced an increase in mitochondria number and dendritic spine synapse in hippocampus, mainly in CA1 and dentate gyrus. Thus moderate exercise would ameliorate the development of ongoing neurodegeneration processes by preventing tau hyperphosphorylation, GSK3 β activation, and synaptophysin loss.

Regarding the treadmill handling used for the NoEXE control group, this procedure has been reported to modify learning performance and neuroplasticity markers in the hippocampus (24). The results of our experiments showed that sirtuin 1 and other parameters, such as IGF-1, were lower in the SED group than in the other two groups. This observation indicates that these parameters can be affected by both types of intervention, which is also consistent with a report by other authors (24). However, it is noteworthy to say that sirtuin 1 and IGF-1 levels were higher in the EXE than in the NoEXE group, thus emphasizing the positive effect of exercise on these two parameters. Moreover, AMPK activation, mitochondrial activity, and tau phosphorylation determination were affected only in the handling plus exercise group. Thus exercise per se, but not handling, contributed to these changes.

In conclusion, although the benefits of moderate exercise on brain functions are controversial, in our rodent model, exercise induced improvements in several major brain parameters, especially in the hippocampus. Examples of these improvements are as follows: upregulation of molecules that extend life, such as sirtuin 1; stimulation of mitochondrial biogenesis in dentate gyrus; activation of AMPK; and prevention of signs of neurodegeneration. These observations support the findings of several reports describing that exercise produces various major benefits related to hormesis and that the mild oxidative stress produced during exercise results in favorable adaptations that protect organisms against more severe stress or disorders.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Language Advisory Service of the University of Barcelona for revising the manuscript.

GRANTS

This study was supported by grants SAF-2009-13093, PSI2008-06417-C03 from the "Ministerio de Educación y Ciencia", PI080400 and DPS2008-06998-C01, C02 from the "Instituto de Salud Carlos III", 2009/SGR00893 from the "Generalitat de Catalunya," and 610RT0405 from the Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). S. Bayod was supported by a predoctoral fellowship (APIF) from University of Barcelona. J. F. Lanza was supported by a predoctoral fellowship from the Generalitat de Catalunya (FI-DGR 2011).

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

REFERENCES

- Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431: 805–810, 2004.
- Canto C, Auwerx J. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol* 20: 98–105, 2009.
- Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD $^{+}$ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458: 1056–1060, 2009.
- Chabi B, Adhihetty PJ, O'Leary MF, Menzies KJ, Hood DA. Relationship between Sirt1 expression and mitochondrial proteins during conditions of chronic muscle use and disuse. *J Appl Physiol* 107: 1730–1735, 2009.
- Chan KL, Tong KY, Yip SP. Relationship of serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and health-related lifestyle in healthy human subjects. *Neurosci Lett* 447: 124–128, 2008.
- Colcombe SJ, Kramer AF, McAuley E, Erickson KI, Scalf P. Neurocognitive aging and cardiovascular fitness: recent findings and future directions. *J Mol Neurosci* 24: 9–14, 2004.
- Costford SR, Bajpeyi S, Pasarica M, Albarado DC, Thomas SC, Xie H, Church TS, Jubrias SA, Conley KE, Smith SR. Skeletal muscle NAMPT is induced by exercise in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E117–E126, 2010.
- Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci* 30: 464–472, 2007.
- Dietrich MO, Andrews ZB, Horvath TL. Exercise-induced synaptogenesis in the hippocampus is dependent on UCP2-regulated mitochondrial adaptation. *J Neurosci* 28: 10766–10771, 2008.
- Gomez-Pinilla F, Vaynman S, Ying Z. Brain-derived neurotrophic factor functions as a metabotrophin to mediate the effects of exercise on cognition. *Eur J Neurosci* 28: 2278–2287, 2008.
- Heyn P, Abreu BC, Ottenbacher KJ. The effects of exercise training on elderly persons with cognitive impairment and dementia: a meta-analysis. *Arch Phys Med Rehabil* 85: 1694–1704, 2004.
- Hipkiss AR. Dietary restriction, glycolysis, hormesis and ageing. *Biogerontology* 8: 221–224, 2007.
- Holloszy JO. Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity. *J Appl Physiol* 99: 338–343, 2005.
- Hood DA, Irrcher I, Ljubicic V, Joseph AM. Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J Exp Biol* 209: 2265–2275, 2006.
- Irrcher I, Adhihetty PJ, Sheehan T, Joseph AM, Hood DA. PPAR- γ coactivator-1 α expression during thyroid hormone- and contractile activity-induced mitochondrial adaptations. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C1669–C1677, 2003.
- Kokkinos P, Myers J. Exercise and physical activity: clinical outcomes and applications. *Circulation* 122: 1637–1648, 2010.
- Koltai E, Szabo Z, Atalay M, Boldogh I, Naito H, Goto S, Nyakas C, Radak Z. Exercise alters SIRT1, SIRT6, NAD and NAMPT levels in skeletal muscle of aged rats. *Mech Ageing Dev* 131: 21–28, 2010.
- Lappalainen Z. Sirtuins: a family of proteins with implications for human performance and exercise physiology. *Res Sports Med* 19: 53–65, 2011.
- Lee IH, Cao L, Mostoslavsky R, Lombard DB, Liu J, Bruns NE, Tsokos M, Alt FW, Finkel T. A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 3374–3379, 2008.
- Li Y, Xu W, McBurney MW, Longo VD. Sirt1 inhibition reduces IGF-I/IRS-2/Ras/ERK1/2 signaling and protects neurons. *Cell Metab* 8: 38–48, 2008.
- Llorens-Martin M, Torres-Aleman I, Trejo JL. Exercise modulates insulin-like growth factor I-dependent and -independent effects on adult hippocampal neurogenesis and behaviour. *Mol Cell Neurosci* 44: 109–117, 2010.
- Llorens-Martin M, Torres-Aleman I, Trejo JL. Growth factors as mediators of exercise actions on the brain. *Neuromolecular Med* 10: 99–107, 2008.
- Marton O, Koltai E, Nyakas C, Bakonyi T, Zenteno-Savin T, Kumagai S, Goto S, Radak Z. Aging and exercise affect the level of protein acetylation and SIRT1 activity in cerebellum of male rats. *Biogerontology* 11: 679–686, 2010.
- O'Callaghan RM, Ohle R, Kelly AM. The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: a comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. *Behav Brain Res* 176: 362–366, 2007.
- O'Callaghan RM, Griffin EW, Kelly AM. Long-term treadmill exposure protects against age-related neurodegenerative change in the rat hippocampus. *Hippocampus* 19: 1019–1029, 2009.

26. Pallas M, Camins A. Molecular and biochemical features in Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 12: 4389–4408, 2006.
27. Radak Z, Toldy A, Szabo Z, Siamilis S, Nyakas C, Silye G, Jakus J, Goto S. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochem Int* 49: 387–392, 2006.
28. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434: 113–118, 2005.
29. Salminen A, Ojala J, Huuskonen J, Kauppinen A, Suuronen T, Kaarniranta K. Interaction of aging-associated signaling cascades: inhibition of NF-kappaB signaling by longevity factors FoxOs and SIRT1. *Cell Mol Life Sci* 65: 1049–1058, 2008.
30. Schweitzer NB, Alessio HM, Berry SD, Roeske K, Hagerman AE. Exercise-induced changes in cardiac gene expression and its relation to spatial maze performance. *Neurochem Int* 48: 9–16, 2006.
31. Smith J. Human Sir2 and the 'silencing' of p53 activity. *Trends Cell Biol* 12: 404–406, 2002.
32. Suwa M, Nakano H, Radak Z, Kumagai S. Endurance exercise increases the SIRT1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha protein expressions in rat skeletal muscle. *Metabolism* 57: 986–998, 2008.
33. Tapia-Arancibia L, Aliaga E, Silhol M, Arancibia S. New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. *Brain Res Rev* 59: 201–220, 2008.
34. Trejo JL, Llorens-Martin MV, Torres-Aleman I. The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. *Mol Cell Neurosci* 37: 402–411, 2008.
35. van Praag H. Exercise and the brain: something to chew on. *Trends Neurosci* 32: 283–290, 2009.
36. van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25: 8680–8685, 2005.
37. Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci* 20: 2580–2590, 2004.
38. Vaynman S, Ying Z, Wu A, Gomez-Pinilla F. Coupling energy metabolism with a mechanism to support brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity. *Neuroscience* 139: 1221–1234, 2006.



Publicació 2

**LONG-TERM PHYSICAL EXERCISE INDUCES CHANGES
IN SIRTUIN 1 PATHWAY AND OXIDATIVE PARAMETERS
IN ADULT RAT TISSUES**

Bayod S, Del Valle J, Lalanza JF, Sanchez-Roige S, de Luxán-Delgado B,
Coto-Montes A, Canudas AM, Camins A, Escorihuela RM, Pallàs M

Experimental gerontology. 2012;47(12):925-35.

L'exercici físic es considera una bona pràctica per fer front al deteriorament tant cognitiu com fisiològic associat a l'envelliment. A nivell perifèric, els mecanismes moleculars implicats en els beneficis produïts per la realització d'exercici no estan del tot ben establerts. Una de les característiques del procés d'envelliment, és l'augment de l'estrès oxidatiu i el dany oxidatiu que això comporta; alterant així la viabilitat cel·lular. Així, amb l'objectiu de mantenir un equilibri dels nivells prooxidants i antioxidants, la cèl·lula disposa de tot un conjunt d'enzims antioxidants. D'altra banda, la sirtuïna 1 regula una àmplia varietat de processos com la supervivència cel·lular i l'autofàgia. Donat que la seva activitat depèn dels nivells de NAD^+ , SIRT1 estaria implicada també en la regulació del metabolisme, i on juntament amb l'AMPK i PGC-1 α , regula la biogènesi mitocondrial.

Es va estudiar a nivell del múscul esquelètic (gastrocnemi), fetge i cor en les mateixes rates de la publicació 1, els efectes de l'envelliment per una banda, i per una altra, la realització d'exercici físic moderat de llarg termini i també la simple manipulació dels animals sobre la via de sirtuïna 1 i diferents paràmetres relacionats amb l'angiogènesi, la biogènesi mitocondrial, l'activitat antioxidant i el dany oxidatiu de lípids i proteïnes.

L'exercici físic va augmentar en fetge i en cor els nivells de VEGF; en canvi, aquests van disminuir en múscul. Els nivells proteics de SIRT1 es van incrementar amb l'exercici en tots els teixits, i també la seva activitat, observant-se un descens de p53 acetilada (excepte en cor). En canvi, els nivells de NAMPT sol van augmentar en múscul. PGC-1 α va incrementar-se amb l'exercici en tots els teixits, però no es van observar canvis en els nivells d'AMPK fosforilada (si que van disminuir amb l'edat en fetge i múscul). En canvi, sols es va mesurar un augment d'alguns dels complexos del sistema OXPHOS en el múscul. Quant a la maquinària antioxidant, l'activitat antioxidant no enzimàtica (FRAP) va augmentar amb l'exercici en el fetge. En general, l'activitat dels enzims antioxidants SOD i CAT no va variar amb l'edat, però si que ho van fer els seus nivells proteics, augmentant en el múscul amb l'edat i en major grau amb l'exercici, observant-se així un descens del dany oxidatiu tant de proteïnes com de lípids (en el fetge, sols el dany proteic).

Resumint, l'exercici físic incrementa a nivell perifèric els nivells proteics de PGC-1 α i també de SIRT1 (a més d'activar-la). En canvi, tan sols augmenta els nivells dels enzims antioxidants, -reduint així el dany oxidatiu-, i estimula la biogènesi mitocondrial principalment en múscul. Cal destacar que en alguns casos també es van establir canvis amb la manipulació dels animals.



Long-term physical exercise induces changes in sirtuin 1 pathway and oxidative parameters in adult rat tissues

S. Bayod ^{a,e}, J. del Valle ^{a,d,e}, J.F. Lalanza ^{b,d}, S. Sanchez-Roige ^{b,d}, B. de Luxán-Delgado ^c, A. Coto-Montes ^c, A.M. Canudas ^{a,e}, A. Camins ^{a,e}, R.M. Escorihuela ^{b,d}, M. Pallàs ^{a,d,*}

^a Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, Barcelona, Spain

^b Departament de Psiquiatria i Medicina Legal, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain

^c Departamento de Morfología y Biología Celular, Facultat de Medicina, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

^d Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

^e Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 June 2012

Received in revised form 13 August 2012

Accepted 14 August 2012

Available online 23 August 2012

Section Editor: Christiaan Leeuwenburgh

Keywords:

Sirtuin 1

AMPK

PGC-1 α

Mitochondrial biogenesis

Oxidative stress

Treadmill

Liver

Heart

Muscle

ABSTRACT

The protein deacetylase, sirtuin 1, is suggested as a master regulator of exercise-induced beneficial effects. Sirtuin 1 modulates mitochondrial biogenesis, primarily via its ability to deacetylate and activate proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α), interacting with AMPK kinase. Redox cell status can also influence this regulatory axis and together they form an important convergence point in hormesis during the aging process. Here, we tested whether treadmill training (36 weeks), as a paradigm of long-term moderate exercise, modifies the AMPK–sirtuin 1–PGC-1 α axis and redox balance in rat gastrocnemius muscle, liver and heart. Physical activity induced increases in sirtuin 1 protein levels in all the aged rat tissues studied, as well as total PGC-1 α levels. However, no changes in AMPK activation or significant differences in mitochondrial biogenesis (by measuring electron transport chain protein content) were found after exercise training. Parallel to these changes, we observed an improvement of oxidative stress defenses, mainly in muscle, with modification of the antioxidant enzyme machinery resulting in a reduction in lipid peroxidation and protein carbonylation. Thus, we demonstrate that moderate long-term exercise promotes tissue adaptations, increasing muscle, liver and heart sirtuin 1 protein content and activity and increasing PGC-1 α protein expression. However, AMPK activation or mitochondrial biogenesis is not modified, but it cannot be discarded that its participation in the adaptive mechanism which prevents the development of the deleterious effects of age.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Sirtuin 1 is a NAD⁺-dependent deacetylase involved in aging processes. Sirtuin 1 has several physiological functions, such as control of gene expression, cell cycle regulation, metabolism, oxidative stress response, apoptosis, DNA repair, and aging (Grubisha et al., 2005). As sirtuins are dependent on the NAD⁺/NADH ratio, they are sensitive to the cellular energy and redox status of the cell, which gives them a role as metabolic sensors.

Sirtuin 1 not only deacetylates histones, but also deacetylates non-histone proteins like p53, FoxO family members (forkhead transcription factors) or NF κ B (nuclear factor κ B), as well as peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α), thereby increasing its activity (Kwon and Ott, 2008; Malek et al., 2010). In mammals, CR or resveratrol, activators of sirtuin 1, decreases the

age-related deleterious effects, through oxidative stress diminution and improving antioxidant system efficiency (Colom et al., 2007; Nisoli et al., 2005). Moreover, sirtuin 1 activation by resveratrol has recently been implicated in the mitochondrial biogenesis induced by this polyphenol in liver and muscle cell cultures (Lagouge et al., 2006). Exercise training also improves sirtuin 1 action (Koltai et al., 2010, 2012) and plays a part in improving antioxidant system efficiency and or efficacy (Lappalainen, 2011; Rinaldi et al., 2006).

It is known that mitochondrial dysfunctions may be linked to excessive generation of reactive oxygen species (ROS) mainly in brain (Federico et al., 2012). The involvement of ROS and mitochondria in different molecular pathways controlling lifespan has been reported (Marchi et al., 2012), pointing out the role of ROS as a “balance of power,” directing the cell towards life or death. ROS could have also beneficial effects on organism. These effects may be due to increased formation of reactive oxygen species (ROS) within the mitochondria causing an adaptive response that culminates in subsequently increased stress resistance assumed to ultimately cause a long-term reduction of oxidative stress. This type of retrograde response has been named mitochondrial hormesis or mitohormesis, and may in addition

* Corresponding author at: Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, E-08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 34024530x14; fax: +34 34035982.

E-mail address: pallas@ub.edu (M. Pallàs).

be applicable to the health-promoting effects of physical exercise in humans and, hypothetically, impaired insulin/IGF-1-signaling in model organisms (Ristow and Schmeisser, 2011; Ristow and Zarse, 2010). Metabolic alterations, including changes in energy metabolism, are linked to the AMP kinase (AMPK) energy sensor mechanism, sirtuin 1 and PGC-1 α pathways (Pagliarini et al., 2008). Bori et al. (2012), demonstrated that sirtuin 1, PGC-1 α and AMPK genes are expressed in young human skeletal muscle after exercise while in aged subjects only sirtuin 1 and AMPK were modified, indicating that in young individuals mitochondrial biogenesis-related genes were readily activated, while in aged ones they are attenuated. Exercise can recover partially the adaptive capability to mild oxidative stress that is lost in aging.

Physical exercise is the most effective intervention against several deleterious effects of aging as sarcopenia, metabolic alterations (Pasini et al., 2012), neurodegeneration (Bayod et al., 2011; Mirochnic et al., 2009; Van Praag, 2009) and cognition (Kramer et al., 2006). However, the cellular and molecular mechanisms mediating training-induced adaptations are not yet completely understood. The main goal of this study was to establish a relationship between the long-term moderate exercise, beginning at young age to adulthood, and the sirtuin 1 pathway in rat muscle, liver and heart, taking into account the multiple cellular pathways related to sirtuin 1, such as AMPK and mitochondrial activity.

2. Materials and methods

2.1. Animals and general procedure

Twenty-nine male Sprague–Dawley rats aged 5 weeks at the beginning of the experiment, were used. All rats were obtained from the *Servei d'Estabulari (Universitat Autònoma de Barcelona)*. Animals were housed 2 per cage and had free access to food and water. They were maintained under a 12–12 h light–dark cycle (lights on at 8:00 h) and standard temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Rats were semi-randomly distributed into three experimental groups, balancing the total body weight: exercised (EXE; $n = 12$, 95.49 ± 3.38 g), control (NoEXE; $n = 9$, 102.24 ± 5.2 g) and sedentary (SED; $n = 8$, 95.75 ± 4.81 g) groups. Two rats (EXE) were excluded from all the experiments because they showed signs of distress and did not run. At the end of the experiment rats are 10-months-old. Eight-week-old male rats (YOUNG; $n = 6$) were also killed on the same day in order to include young controls in the analysis. The animals were then killed by decapitation between 9 am and 12 noon. The liver, heart and gastrocnemius muscle were immediately removed and frozen in powdered dry ice and maintained at -80°C until use. The experimental protocol was approved by the *Ethics Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona* and complied with the 'Principles of laboratory animal care' and the European Communities Council Directive (86/609/EEC).

2.2. Exercise regime

A treadmill consisting of 3 parallel runways (45 cm long, 11 cm wide and 12 cm deep) was used. The apparatus was placed at an inclination of 0° in the cage. Exercise sessions were conducted between 1:30 pm and 4:30 pm, 4–5 days per week for 36 weeks (152 sessions per animal). Neither electrical shock nor physical prodding was used to force training. On the first day, the rats were placed in the treadmill for 30 min without running to accustom them to the apparatus and to diminish exercise-induced stress during the following days. EXE and NoEXE groups were weighed every day before the 30-min treadmill session. For the EXE group, the treadmill started at a speed of 4.2 m/min, and increased progressively by 1 m/min every 30 s to a speed of 12 m/min. NoEXE rats were placed individually on another treadmill (0 m/s) for the same number of sessions and the same duration as the EXE. Thus, control and exercised rats were handled in the same way and spent the same amount of time out of the

home cage. The SED group was handled once a week for cage cleaning and tail marking.

2.3. Tissue isolation and Western blot analysis

Tissues samples were homogenized in lysis buffer containing phosphatase and protease inhibitors (Cocktail II, Sigma). The protein concentration in tissue samples was determined by the Bradford method. 20 μg of protein was separated by SDS-PAGE (5–15%) and transferred to PVDF membranes (Millipore). The membranes were blocked in 5% non-fat milk in TBS containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) for 1 h at room temperature, followed by overnight incubation at 4°C with antibodies diluted in TBS-T and 5% BSA sirtuin 1 (1:1000; Millipore), p53 (1:1000; Cell Signaling), acetyl p53 (1:500; Abcam), nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) (1:1000; Abcam), AMPK α (1:500; Cell Signaling) and p-AMPK α Thr¹⁷² (1:500; Cell Signaling), OXPHOS cocktail and porin (1:500; MitoSciences), catalase (1:2000; Calbiochem), superoxide dismutase (1:3000; Calbiochem), PGC1- α (1:500; Cayman Chemical) and GAPDH (1:2000; Millipore). Membranes were then washed and incubated with secondary antibodies for 1 h at room temperature. Protein bands were view by a chemiluminescence detection kit (Amersham Biosciences). Band intensities were quantified by densitometric analysis, and values were normalized to GAPDH or/and porin expression.

2.4. VEGF-1 determination

Vascular endothelial growth factor 1 (VEGF-1) tissue levels were determined by ELISA kit (Quantikine®, Rat VEGF RRV00, R&D Systems, Wiesbaden, Germany) following the recommendations of the manufacturer.

2.5. Estimation of total antioxidant activity

The ferric iron reducing ability of plasma (FRAP) was used to determine the total antioxidant power according to the method of Benzie and Strain (1996). In brief, FRAP values were obtained by measuring ferric to ferrous ion reduction at low pH (300 mmol/L acetate buffer, pH 3.6), coupled with tripyridyltriazine, a blue-colored complex, whose absorbance was measured at 593 nm.

Tissues were minced in 0.05 M phosphate buffer, (pH 7.8) to 10% final concentration using homogenizer Ultra Turrax T25 basic ultraspeed tissue grinder (16000 l/min bursts). All procedures were performed on ice. Homogenized tissues were centrifuged at $1000 \times g$ for 15 min ($0-4^\circ\text{C}$). The resulting supernatant was drawn and the pellet was discarded.

The 6 μl of each sample was mixed with 180 μl reagent mixture [30 ml, consisting of 25 ml of acetate buffer (300 mM; pH 3.6), 2.5 ml 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (5 mM TPTZ) in 40 mM HCl, and 2.5 ml ferric solution (20 mM FeCl_3) in distilled water]. Reagent mixture was prepared fresh each time. Concentration of FRAP calculated by preparing a standard curve between 0 and 1 mM of known Fe^{2+} /sample using $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ as the standard. The blank contained FRAP reagent mixture. Reactions were performed for 5 min at 37°C . FRAP values were expressed in μmol of Fe^{II} equivalents/mg of protein.

2.6. Catalase and superoxide dismutase activities

Catalase (CAT) activity was determined by the Cohen et al. (1970) method, by monitoring the rate of disappearance of hydrogen peroxide (15 mM) in a Lambda 2 PerkinElmer spectrophotometer. Values are expressed in terms of units/mg of protein (one unit, U = $1 \mu\text{mol}$ of hydrogen peroxide transformed/min).

Superoxide dismutase (SOD) activity was measured by the Misra and Fridovich (1972) method based on the autooxidation of epinephrine and expressed as units/mg of protein (one unit, U = the amount

of sample that inhibits the transformation of epinephrine into adrenochrome by 50%).

2.7. Lipid and protein damage

Lipid peroxidation and protein damage were determined as described previously (Vega-Naredo et al., 2012). Lipid peroxidation was measured by determining malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) with a Lipid Peroxidation Assay Kit from Calbiochem (EMD Biosciences Inc., Darmstadt, Germany) and values were expressed as nmol of MDA and 4-HNE/mg of protein.

Protein damage was determined as carbonylated proteins. The chromogene 2,4-dinitrophenylhydrazine reacted with the carbonyl groups of the damaged proteins. Data are presented as nmol protein carbonyl/mg protein.

2.8. Data analysis

Data are expressed as the mean \pm SEM, from at least five to six samples. In all cases, data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc Tukey–Kramer multiple-comparison tests. *P* values lower than 0.05 were considered significant.

3. Results

At the end of the experimental protocol, the different experimental groups did not demonstrate any significant changes in weight gain (Lalanza et al., 2012). Cardiac hypertrophy was measured as a cardiac parameter that can be affected by exercise. Our results (heart weight/rat weight) showed that the moderate exercise designed in the experiment, did not affect the cardiac remodeling (Fig. 1A).

VEGF levels were higher in liver and heart of EXE animals than in SED rats. Surprisingly, levels in muscle were lower in EXE rats than in SED ones (Fig. 1B–D).

3.1. Oxidative parameters after long-term exercise in muscle, liver and heart

Effects of exercise protocol were studied in terms of oxidative stress. First, the biochemical parameter of total antioxidant capacity was FRAP measurement. As Fig. 2 shows, no significant changes were found in plasma, muscle or heart. In liver, exercise caused a significant increase in the FRAP value, which reflects an increase in total antioxidant capacity in this tissue.

The levels of SOD and CAT in the studied tissues were also determined (Figs. 3 and 4). Our results showed that, in muscle, CAT and SOD protein contents were higher in EXE animals than in SED or NoEXE ones, but no changes in activity were found. In liver no modifications were found in CAT and SOD protein levels, but significantly greater SOD activity was seen in EXE and NoEXE animals than in SED ones. The results for heart showed alterations in CAT activity, but not in the protein levels of antioxidant machinery enzymes.

The total protein damage assay (Fig. 5) found a significantly greater reduction in carbonylated proteins in the muscle and liver of EXE animals than in those of SED rats (Fig. 5A–B). Conversely, in the heart we found an increase in protein damage in EXE than in SED rats (Fig. 5C), coinciding with a decrease in CAT activity.

In the case of lipid peroxidation (Fig. 5), long-term moderate exercise induced a reduction in oxidative status of lipids in muscle of EXE animals, but a significant effect was also observed in NoEXE rats, reaching the value in young animals (Fig. 5D). However, no changes in lipoperoxidation parameters were induced in liver and heart tissues of experimental groups (Fig. 5E–F).

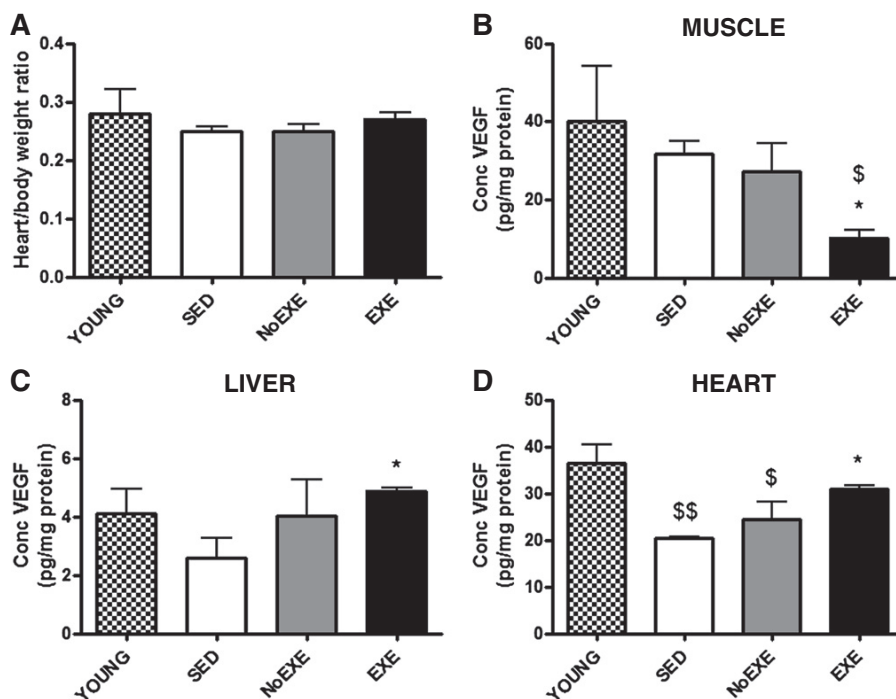


Fig. 1. Heart weight/body weight ratio, indicative of cardiac hypertrophy. Results showed that there are no differences between groups (A). Levels of VEGF in muscle (B), liver (C) and heart (D) for young (YOUNG), sedentary (SED), non-exercised (NoEXE) and exercised (EXE) rats. Results are mean \pm SEM of 5–6 independent experiments. **p* < 0.05 vs. SED; [§]*p* < 0.05, ^{§§}*p* < 0.01 vs. YOUNG.

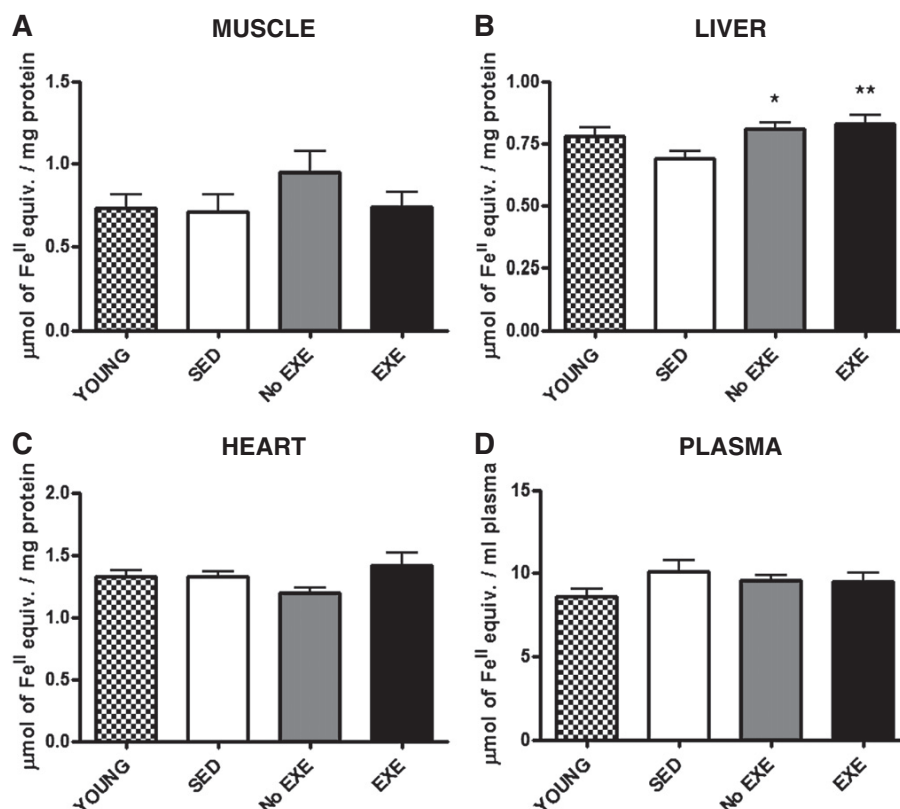


Fig. 2. Analysis of antioxidant capacity by FRAP method in muscle (A), liver (B), heart (C) and plasma (D) for young (YOUNG), sedentary (SED), non-exercised (NoEXE) and exercised (EXE) rats. Results are mean \pm SEM of 5–6 independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. SED.

3.2. Sirtuin 1 regulation by long-term running in rat tissues

During 36 weeks of treadmill, changes in sirtuin 1 expression and p53 acetylation were detected. The exercise protocol increased sirtuin 1 protein levels in all of the tissues studied (Figs. 6A–8A).

To investigate whether the sirtuin 1 pathway was regulated under conditions of exercise, sirtuin 1 activity, through p53 acetylation levels as well as NAMPT and pAMPK expression, was measured. Results of acetylation of p53 levels in muscle and liver showed a clear reduction in the acetylated form in EXE samples when compared with SED rats (Figs. 6A and 7A). It should be noted that SED animals have higher acetylated levels of p53 as compared to YOUNG rats. No changes in these parameters were found in the heart (Fig. 8A). Protein levels of NAMPT liver (Fig. 7B) and heart (Fig. 8B) were similar in all groups examined, but an increase in the muscle tissue of the limiting NAD⁺ production rate enzyme was observed in EXE rats (Fig. 6B).

AMPK activity was measured through the levels of phosphorylation in Thr 172. Results indicated no changes in activation among aged rats in all tissues tested, but there was a significant reduction with regard to young animals in muscle and liver (Figs. 9A and 10A).

Total PGC-1 α protein content was greater in EXE rats than in SED ones, in all tissues (Figs. 9B, 10B, and 11B). In the muscle of NoEXE rats PGC-1 α also increased (Fig. 9B).

OXPHOS system (oxidative phosphorylation) content was used as an indirect marker of mitochondrial content, as was determined previously by Bayod et al. (2011). When mitochondrial complexes were determined by OXPHOS content, no robust differences were observed in tissues (Supplementary data, Figs. 12–14). No significant changes were found in any tissue in experimental aged rat groups, except an

increase of complex II in EXE rats' muscle. Significant increases in complexes I, III and IV were found in the muscle of aged animals in reference of young animals (Supplementary data, Figs. 12–14).

4. Discussion

The main aim of this study was to examine the sirtuin 1 activation and related pathways (systems) after long-term moderate exercise, every day after, similar to the rapid walking or slow running in humans (Haskell et al., 2007); not endurance exercises, which have been reported elsewhere. Moderately intense exercise for 30 min, 5 days a week has beneficial effects in adult and older adult humans (Colcombe and Kramer, 2003; Rolland et al., 2010; Slentz et al., 2011). However, the extent to which greater levels of exercise have additional healthy effects is unclear (Koopman, 2011; Martinez et al., 2011; Roden, 2012). In rodents, the voluntary wheel running and the forced treadmill training are the two main procedures used to investigate the effects of physical exercise and they have shown to produce differential effects (Burghardt et al., 2004; Leasure and Jones, 2008). Even the former model is the most used and its beneficial results on synaptic plastic and cognitive improvement have been consistently demonstrated, it can be argued that the treadmill running model resembles more the characteristic of exercise in humans. Voluntary wheel running implies some problems like social isolation (Grippe et al., 2007; Stranahan et al., 2009) and there is a lot of variability in the amount of exercise performed with voluntary wheel running (García-Capdevila et al., 2009). These inconveniences are avoided in the treadmill paradigm. In addition to its analogy with the human apparatus, treadmill regular running of moderate intensity

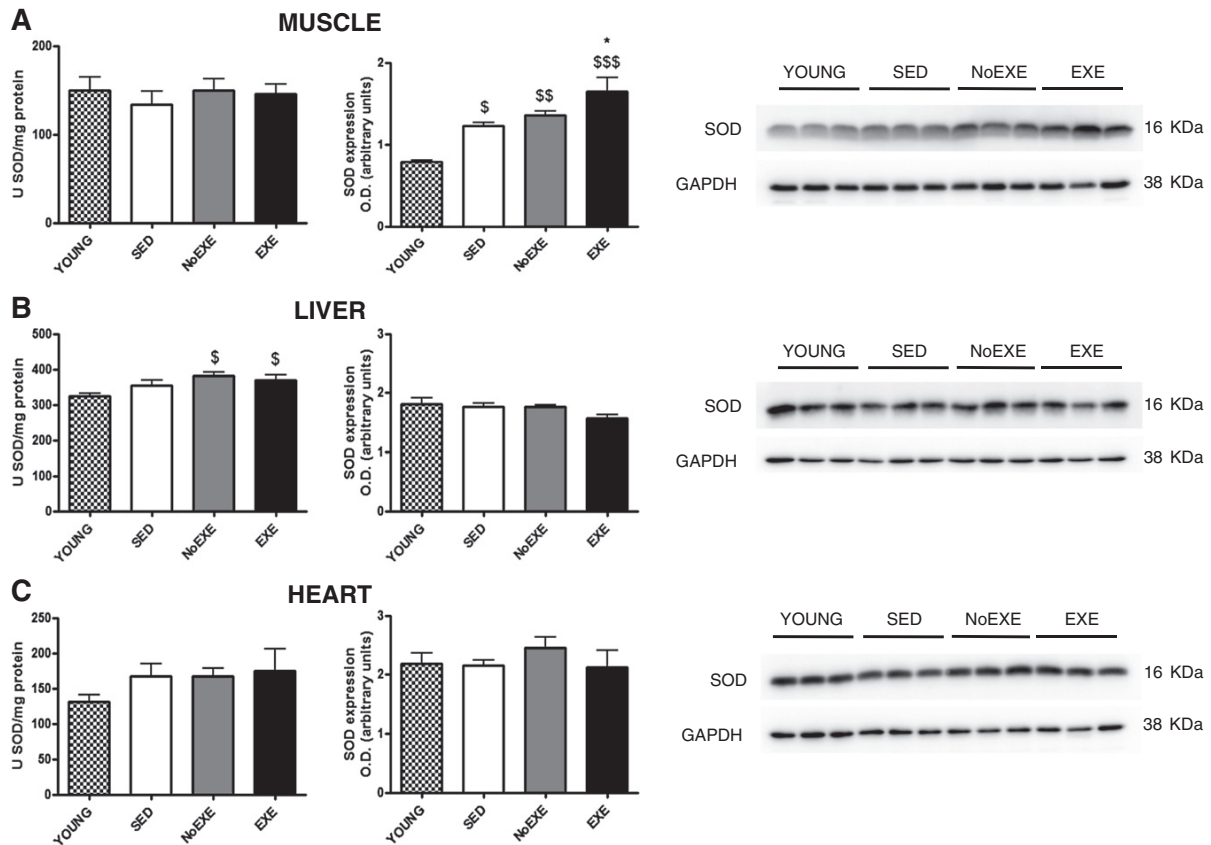


Fig. 3. Activity and protein levels of superoxide dismutase (SOD) in muscle (A), liver (B) and heart (C), for young (YOUNG), sedentary (SED), non-exercised (NoEXE) and exercised (EXE) rats. Images show representative Western blot and bar graph obtained from semi-quantitative image analysis, as described in the [Materials and methods](#) section. Results are mean \pm SEM of 5–6 independent experiments. * $p < 0.05$ vs. SED; $^{\$}p < 0.05$, $^{\$\$}p < 0.01$, $^{\$ \$ \$}p < 0.001$ vs. YOUNG.

reflects the attitude of many human subjects toward exercise (Uda et al., 2006; Winter et al., 2007).

Moderate forced exercise from early ages to adulthood has an important long-term impact on animal health. Previously, we determined that exercise, but not handling, reduced plasma levels of glucose, cholesterol and triglycerides, suggesting beneficial metabolic consequences (Lalanza et al., 2012). In the brain, we demonstrated a robust action of exercise in activation of sirtuin 1 pathways and neuroprotective effects (Bayod et al., 2011). We demonstrated, in the same experimental procedure, an IGF-1 increase in plasma of EXE rats (Bayod et al., 2011) which is intrinsically related with the sirtuin 1 pathway (Longo, 2009). Here we determined that VEGF, a growth factor related to exercise practice (Malek et al., 2010) was greater in EXE rat liver and heart than in SED animals, but was lower in the gastrocnemius muscle, probably due to an adaptive process after 36 weeks of exercise in the main tissue affected by exercise.

We found that after moderate exercise, sirtuin 1 expression increased significantly in the liver, muscle and the heart of exercised aged rats in reference to the other aged rats and young group.

To determine the effect of the increase in sirtuin 1 expression, we studied the acetylation of a specific substrate of sirtuin 1, p53. Results showed the sirtuin 1 increased levels correlating with a reduction in acetylated form of p53, in the muscle and in liver, but not in the heart. Differences in sirtuin 1 response to activators of the deacetylase are not new. Haigis and Guarente (2006) challenged the paradigm that caloric restriction induces sirtuin 1 activity in all tissues by showing that activity of this sirtuin in the liver is, in fact, reduced by caloric restriction and activated by a high-caloric diet (Chen et al., 2008).

Accordingly, with an increase in sirtuin 1 activity after exercise, Koltai et al. (2010) found that the activity per molecule of sirtuin 1 was lower in the skeletal muscle of older rats, suggesting that there are more inactive or less active molecules in these animals, which correlated with total protein acetylation. As mentioned previously, sirtuin 1 activity is dependent on NAD^+ levels. Data in bibliography indicated that aging is associated with decreased levels of NAD^+ . Decreased production of NAD^+ results in cell metabolism changes, causing exhaustion of energy production (Skokowa et al., 2009). Increase in the $NAD^+/NADP$ ratio may be the cause of higher sirtuin 1 action in tissues because of changes in the limiting enzyme of NAD processing (NAMPT). Therefore, we investigated whether long-term exercise prevented aging-associated losses in NAMPT levels, which maintained sirtuin 1 activity in tissues of aged animals. Under our experimental conditions, we demonstrated an increase in NAMPT levels in gastrocnemius muscle in exercised animals, consistent with results obtained in old rats (Koltai et al., 2010). We did not find this correlation in the liver or the heart.

In a model of in vitro exercise, temperature-induced mitochondrial biogenesis correlated with activation of the AMPK–sirtuin 1–PGC-1 α pathway, authors postulated that muscle heat production during exercise plays a role in mitochondrial biogenesis and the participation of the axis AMPK–sirtuin 1–PGC-1 α (Liu and Brooks, 2012; Liu et al., 2008). Accordingly, we found an increase in PGC-1 α content under our experimental conditions in exercised rats in all of the tissues studied. Conversely, we found no differences between EXE rats and control (NoEXE) and sedentary animals in activation of AMPK, kinase related with metabolic rate or sirtuin 1 in liver,

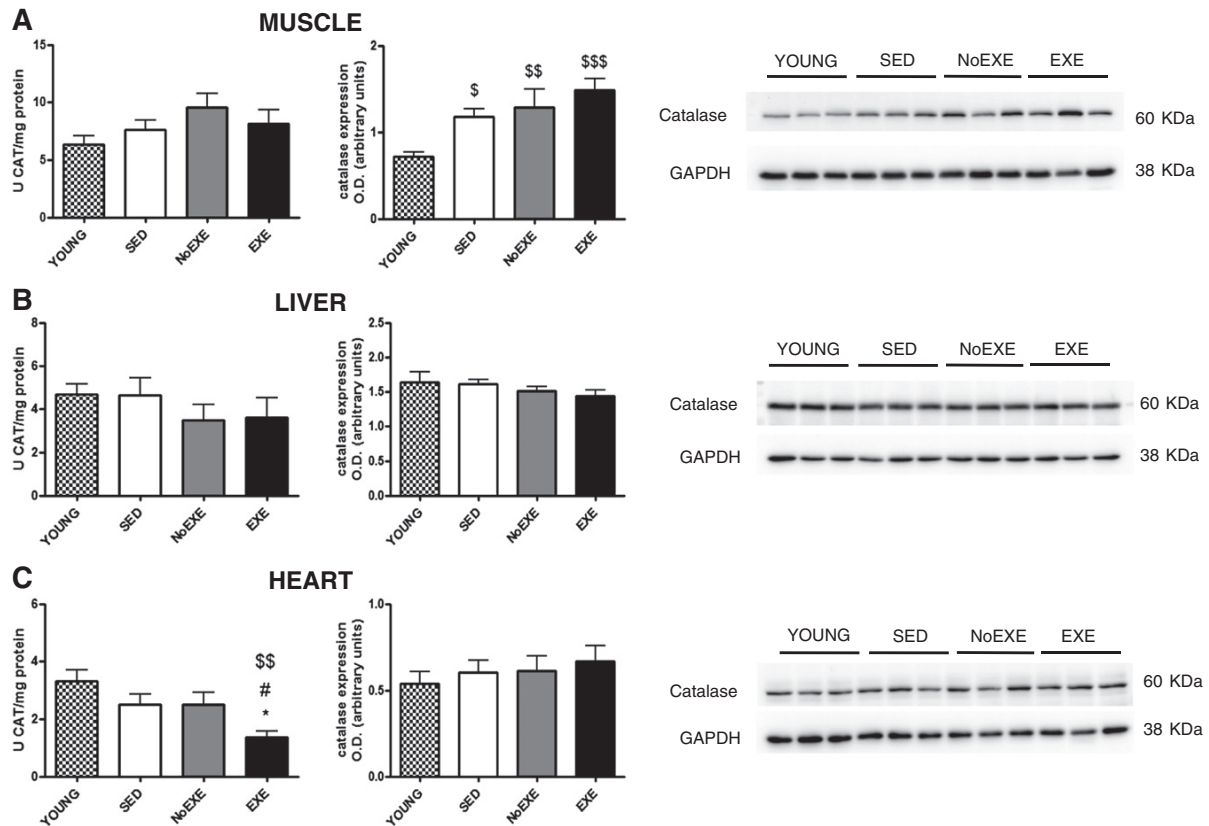


Fig. 4. Activity and protein levels of catalase (CAT) in muscle (A), liver (B) and heart (C), for young (YOUNG), sedentary (SED), non-exercised (NoEXE) and exercised (EXE) rats. Images show representative Western blot and bar graph obtained from semi-quantitative image analysis, as described in the [Materials and methods](#) section. Results are mean \pm SEM of 5–6 independent experiments. * $p < 0.05$ vs. SED; # $p < 0.05$ vs. NoEXE; \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$, \$\$\$ $p < 0.001$ vs. YOUNG.

muscle or heart after exercise, in contrast with the results observed in several cerebral areas of rats under the same exercise schedule (Bayod et al., 2011).

Mitochondrial biogenesis has been described as a possible target of molecular changes induced by exercise, in which activation of the AMPK–sirtuin 1–PGC-1 α pathway is involved (Cantó and Auwerx,

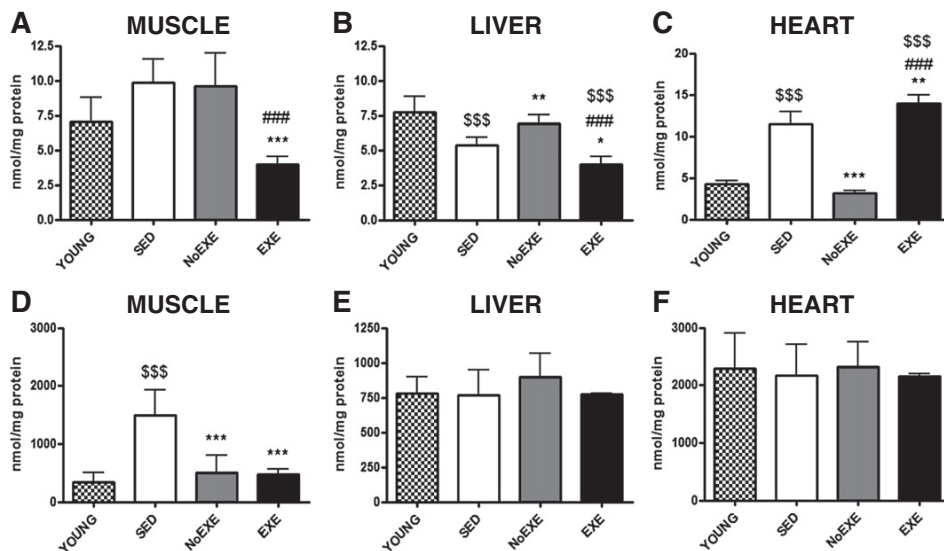


Fig. 5. Levels of carbonylated proteins and lipid peroxidation in muscle (A, D), liver (B, E) and heart (C, F) for young (YOUNG), sedentary (SED), non-exercised (NoEXE) and exercised (EXE) rats. Carbonyl proteins were expressed as nmol of protein carbonyl mg^{-1} of protein and lipoperoxidation was expressed as nmol of malondialdehyde plus 4-hydroxyalkenal mg^{-1} of protein. Results are mean \pm SEM of 5–6 independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. SED; ### $p < 0.001$ vs. NoEXE; \$\$\$ $p < 0.001$ vs. YOUNG.

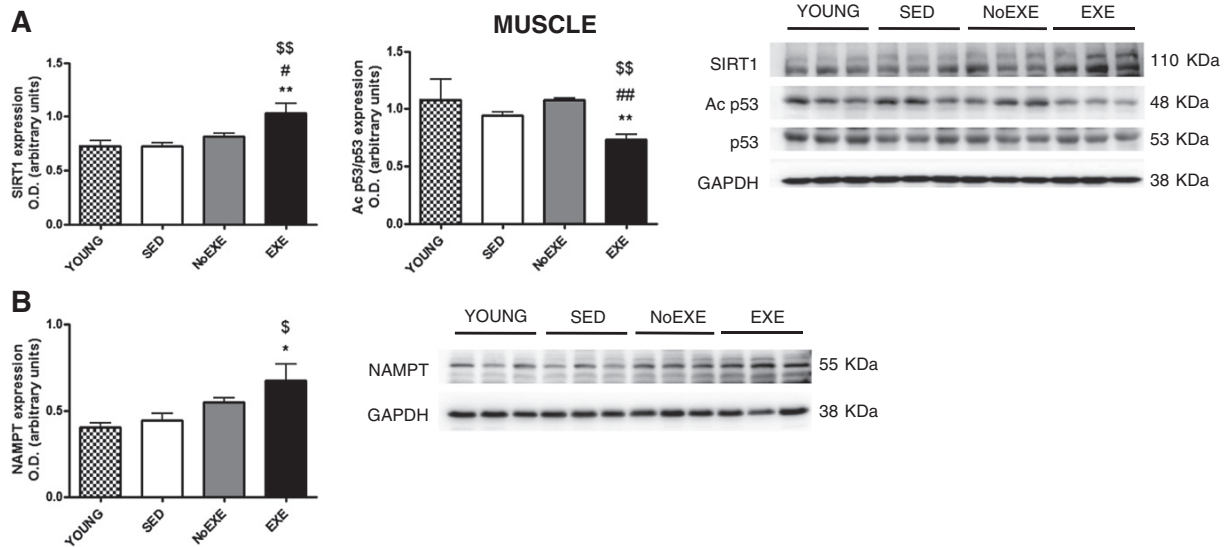


Fig. 6. Sirtuin 1 expression, Ac-p53 (A) and NAMPT (B) levels in muscle for young (YOUNG), sedentary (SED), non-exercised (NoEXE) and exercised (EXE) rats. Images show representative Western blot and bar graph obtained from semi-quantitative image analysis, as described in the [Materials and methods](#) section. Results are mean \pm SEM of 5–6 independent experiment. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. SED; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. NoEXE; \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$ vs. YOUNG.

2009). Published data suggest that moderate levels of regular physical activity increase a larger number of mitochondrial biogenesis-related gene expressions in aged subjects, though to a lesser extent than in younger individuals (Bori et al., 2012). In reference to the mitochondrial content after long-term exercise, several mitochondrial oxidative phosphorylation subunits were upregulated in the muscle, but not in the liver or the heart, as that in NAMPT levels. In contrast, increased PGC-1 α correlating with mitochondrial mass was found in all tissues. These results corroborate several authors who report how sirtuin 1 expression and activity correlate directly with the resulting increase in mitochondrial biogenesis and that not all tissues respond equally to strategies modifying sirtuin activity (Chen et al., 2008; Colcombe and Kramer, 2003). Differences between

results obtained here, in the analyzed tissues, and other reports in the bibliography (Philp et al., 2011) can be explained because of differences in the long-term exercise schedule. It is possible that sirtuin 1 was induced early in our exercise protocol (i.e. before 36 weeks), when the work performed was at its peak and when the rate of mitochondrial biogenesis might be expected to be at its highest. Thus, our tissue sampling time could have missed the early adaptive response. This is further reinforced by the recent data of Gurd et al. (2008), who indicated that activation of several pathways involving sirtuin 1, as well as other proteins, probably coexists for mitochondrial biogenesis and PGC-1 α activation, depending on exercise intensity (Ljubicic and Hood, 2008; Ljubicic et al., 2008) and duration. Divergent results given

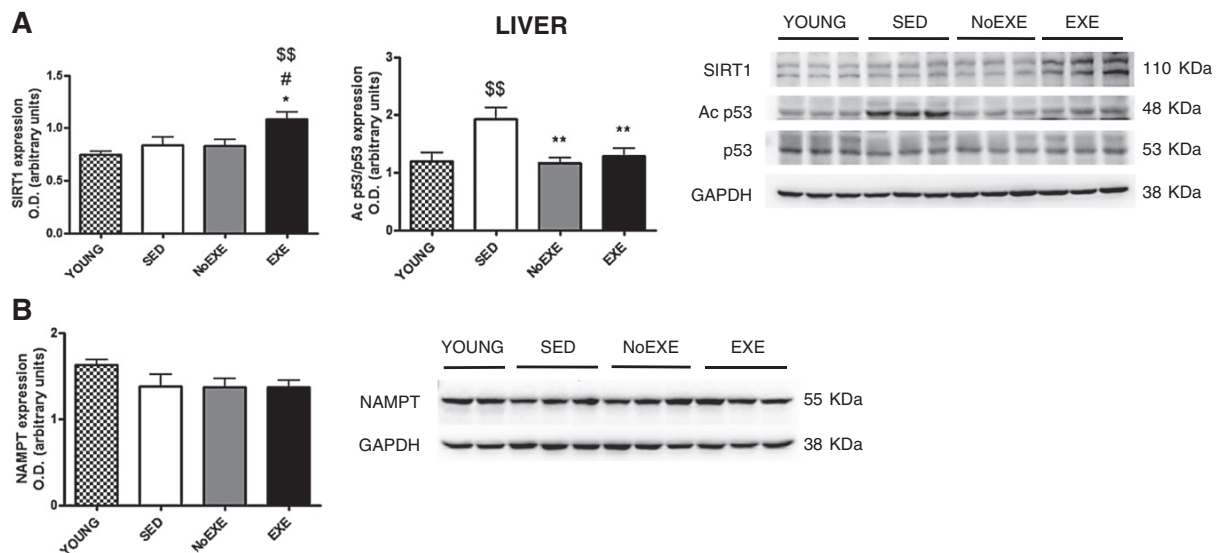


Fig. 7. Sirtuin 1 expression, Ac-p53 (A) and NAMPT (B) levels in liver for young (YOUNG), sedentary (SED), non-exercised (NoEXE) and exercised (EXE) rats. Images show representative Western blot and bar graph obtained from semi-quantitative image analysis, as described in the [Materials and methods](#) section. Results are mean \pm SEM of 5–6 independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. SED; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. YOUNG.

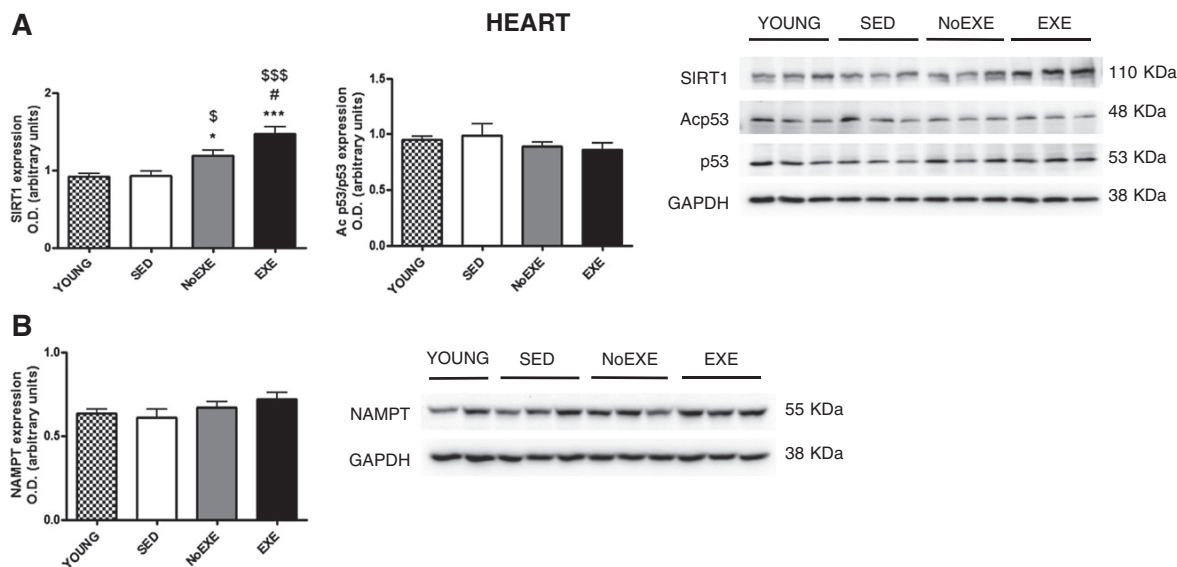


Fig. 8. Sirtuin 1 expression, Ac-p53 (A) and NAMPT (B) levels in heart for young (YOUNG), sedentary (SED), non-exercised (NoEXE) and exercised (EXE) rats. Images show representative Western blot and bar graph obtained from semi-quantitative image analysis, as described in the [Materials and methods](#) section. Results are mean \pm SEM of 5–6 independent experiments. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. SED; # $p < 0.05$, \$\$\$ $p < 0.001$ vs. YOUNG.

by Suwa et al. (2008) may be related to the employment of different exercise intensities. These authors applied a program of enforced treadmill training, which is greater in intensity than long-term exercise.

Mitochondria and ROS signaling tightly control cellular homeostasis by regulating fundamental cell-death and cell survival processes, in a hormetic process (Ristow and Schmeisser, 2011). Although correlation between mitochondrial ROS and aging has been the subject of debate for over 40 years (Gaman et al., 2011; Marchi et al., 2012) recent discoveries about the role of autophagy in cleaning up damaged mitochondria, prolonging lifespan, underline the importance of studying ROS dynamics. Oxidative stress is significantly higher in aged animals. A promising approach for slowing down aging and achieving a healthy senescence is represented by repeated exposure

to various mild stresses (caloric restriction, moderate exercise, nutritional or pharmacological hormetins) (Gaman et al., 2011). This oxidative damage may partially inhibit sirtuin 1 activity as many other proteins do (Radak et al., 2008a). In fact, the pathophysiology of aging and age-related diseases involves oxidative stress as an early stage in its development. It is known that exercise alters the oxidative enzymes by increasing cortisol levels, and reducing antioxidant molecule production like melatonin. However, in the present schedule of exercise, there are no changes in ACTH cortisol levels in basal conditions (Lalanza et al., 2012). In skeletal muscle glucose restriction and exercise diminish the ATP/AMP ratio and activate AMPK, which leads to an increase in NAD availability by inducing NAMPT expression. The consequent increase in sirtuin 1 content and/or activity

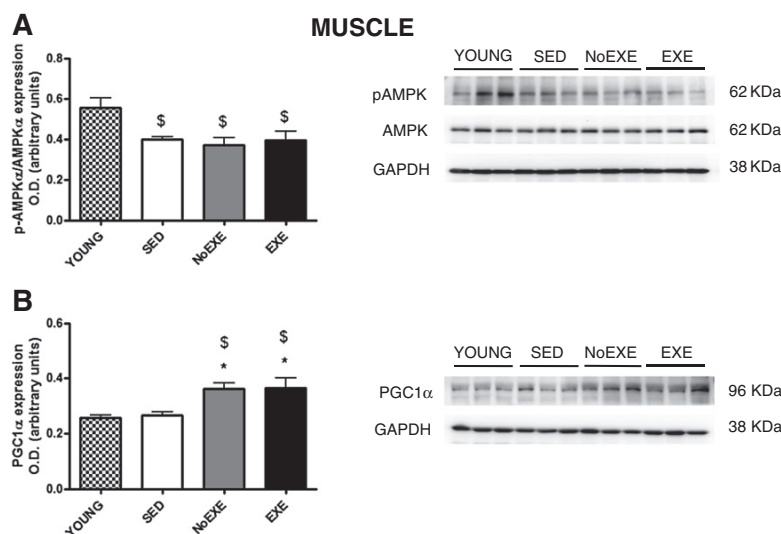


Fig. 9. p-AMPKαThr¹⁷²/AMPK activation (A) and PGC1α expression (B) in muscle for young (YOUNG), sedentary (SED), non-exercised (NoEXE) and exercised (EXE) rats. Images show representative Western blot and bar graph obtained from semi-quantitative image analysis, as described in the [Materials and methods](#) section. Results are mean \pm SEM of 5–6 independent experiments. * $p < 0.05$ vs. SED; \$ $p < 0.05$ vs. YOUNG.

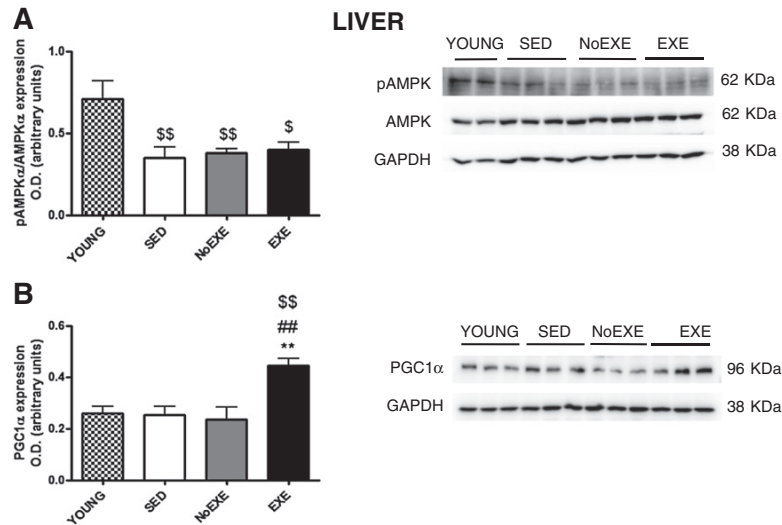


Fig. 10. p-AMPKαThr¹⁷²/AMPK activation (A) and PGC1α expression (B) in liver for young (YOUNG), sedentary (SED), non-exercised (NoEXE) and exercised (EXE) rats. Images show representative Western blot and bar graph obtained from semi-quantitative image analysis, as described in the [Materials and methods](#) section. Results are mean ± SEM of 5–6 independent experiments. **p<0.01 vs. SED; ##p<0.01 vs. NoEXE; ^sp<0.05, ^{ss}p<0.01 vs. YOUNG.

modulates the transcriptional activity of FoxO4 and PGC-1α. Whereas PGC-1α promotes oxidative metabolism and the conversion from glycolytic to oxidative fibers, FoxO4 triggers a response that prevents oxidative damage (Pardo et al., 2011). The activation of sirtuin 1 may also trigger increased SOD transcription. Here we have found no increase in total antioxidant capacities in muscle, heart or plasma of EXE rats over SED ones. In liver differences were found, but in both NoEXE and EXE animals, which meant that this effect was exercise-independent. With regard to antioxidant enzyme levels, we detected an increase in SOD and catalase in muscle of EXE rats, but not in liver or heart. However, as other authors reported (Filaire et al., 2009), SOD and catalase activities did not change.

Pardo et al. (2011), indicated that radical oxygen species scavenging might be a consequence of the effects mediated by the induction of sirtuin 1 in response to exercise. It should also be noted that sirtuin

1 is a pivotal regulator of lifespan and that aging affects sirtuin 1 levels differentially in various organs (Kwon and Ott, 2008). Caloric restriction enhances longevity from yeast to mammals, through sirtuin 1 activation, and induces physiological and behavioral changes (Corbi et al., 2012). Several studies have reported that in aged rats (24 months), sirtuin 1 activity decreased in the heart and adipose tissue, showing that aging is characterized in vivo by reduced efficiency of this longevity key-regulator (Ferrara et al., 2008).

Changes in redox homeostasis obtained after long-term moderate exercise are consistent with oxidative protein damage (protein carbonyl levels) and lipid peroxidation, which were both lower in muscle of EXE animals than SED ones. Then, we found evidence that long-term moderate exercise is better than excessive exercise and over-training in terms of improvement of redox homeostasis, in line with other authors (Pasini et al., 2012; Radak et al., 2008b).

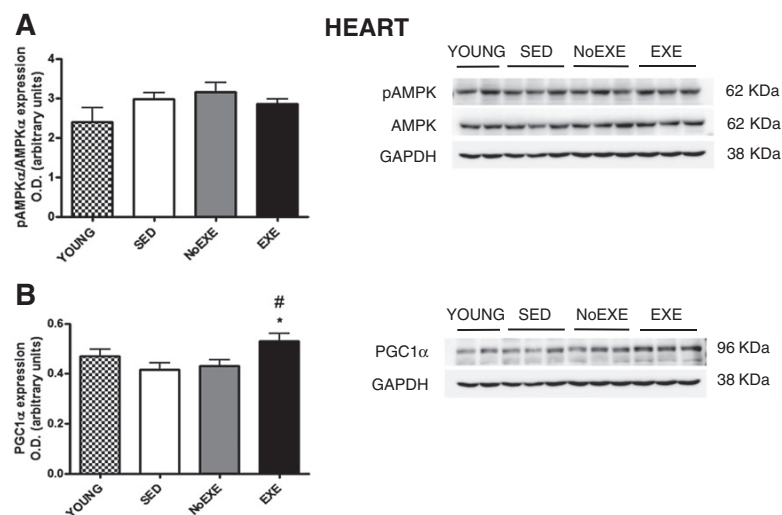


Fig. 11. p-AMPKαThr¹⁷²/AMPK activation (A) and PGC1α expression (B) in heart for young (YOUNG), sedentary (SED), non-exercised (NoEXE) and exercised (EXE) rats. Images show representative Western blot and bar graph obtained from semi-quantitative image analysis, as described in the [Materials and methods](#) section. Results are mean ± SEM of 5–6 independent experiments. *p<0.05 vs. SED; #p<0.05 vs. NoEXE.

We suggest that long-term exercise, with a moderate schedule, as in our experimental design, avoids the oxidative stress associated with an endurance exercise and allows the tissues to initiate molecular processes, such as sirtuin 1 pathway activation and mitochondria efficiency, widely described as highly efficacious in preventing frailty in aging.

5. Conclusions

In conclusion, although benefits of moderate exercise are clear, the mechanisms are controversial. The overall findings of this study was that a moderate treadmill protocol that mimics rapid walking or slow running in humans results in activation of sirtuin 1 pathways and PGC1 α but not in changes in AMPK activation or mitochondrial biogenesis (via measurement of electron transport proteins). Oxidative stress defenses primarily in muscle were also improved in the EXE group. The authors conclude that these results support the use of moderate physical activity and its hormetic effects to test for the prevention of age-related disorders such as low exercise capacity and frailty.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2012.08.004>.

Acknowledgments

We thank the Language Advisory Service of the University of Barcelona for revising the manuscript. This study was supported by grants SAF-2009-13093 and SAF-2011-23631 from the “Ministerio de Educación y Ciencia”, DPS2008-06998-CO1, CO2 from the “Instituto de Salud Carlos III”, 2009/SGR00893 from the “Generalitat de Catalunya” and 610RT0405 from the Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).

S.B. was supported by a predoctoral fellowship (APIF) from the University of Barcelona. J.F.L. was supported by a predoctoral fellowship from the Generalitat de Catalunya (FI-DGR 2011); B.L.-D. was supported by a predoctoral fellowship from Principado de Asturias (BP11-135).

References

- Bayod, S., Del Valle, J., Canudas, A.M., Lanza, J.F., Sanchez-Roige, S., Camins, A., Escorihuela, R.M., Pallàs, M., 2011. Long-term treadmill exercise induces neuroprotective molecular changes in rat brain. *J. Appl. Physiol.* 111 (5), 1380–1390.
- Benzie, I.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239 (1), 70–76.
- Bori, Z., Zhao, Z., Koltai, E., Fatouros, I.G., Jamurtas, A.Z., Douroudos, I.L., Terzis, G., Chatzinikolaou, A., Sovatzidis, A., Draganidis, D., Boldogh, I., Radak, Z., 2012. The effects of aging, physical training, and a single bout of exercise on mitochondrial protein expression in human skeletal muscle. *Exp. Gerontol.* 47 (6), 417–424.
- Burghardt, P.R., Fulk, L.J., Hand, G.A., Wilson, M.A., 2004. The effects of chronic treadmill and wheel running on behavior in rats. *Brain Res.* 1019 (1–2), 84–96.
- Cantó, C., Auwerx, J., 2009. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr. Opin. Lipidol.* 20 (2), 98–105.
- Chen, D., Bruno, J., Easlou, E., Lin, S.J., Cheng, H.L., 2008. Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction. *Genes Dev.* 22 (13), 1753–1757.
- Cohen, G., Dembiec, D., Marcus, J., 1970. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal. Biochem.* 34, 30–38.
- Colcombe, S., Kramer, A.F., 2003. Fitness effects on the cognitive function of older adults: a meta-analytic study. *Psychol. Sci.* 14 (2), 125–130.
- Colom, B., Oliver, J., Roca, P., Garcia-Palmer, F.J., 2007. Caloric restriction and gender modulate cardiac muscle mitochondrial H(2)O(2) production and oxidative damage. *Cardiovasc. Res.* 74, 456–465.
- Corbi, G., Conti, V., Scapagnini, G., Filippelli, A., Ferrara, N., 2012. Role of sirtuins, calorie restriction and physical activity in aging. *Front. Biosci. (Elite Ed.)* 4, 768–778.
- Federico, A., Cardaioli, E., Da Pozzo, P., Formichi, P., Gallus, G.N., Radi, E., 2012. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *J. Neurol. Sci.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2012.05.030>.
- Ferrara, N., Rinaldi, B., Corbi, G., Conti, V., Stiuso, P., Boccuti, S., Rengo, G., Rossi, F., Filippelli, A., 2008. Exercise training promotes SIRT1 activity in aged rats. *Rejuvenation Res.* 11 (1), 139–150.
- Filaire, E., Rouveix, M., Massart, A., Gladine, C., Davicco, M.J., Durand, D., 2009. Lipid peroxidation and antioxidant status in rat: effect of food restriction and wheel running. *Eur. J. Appl. Physiol.* 107 (2), 243–250.
- Gaman, L., Stoian, I., Atanasiu, V., 2011. Can ageing be slowed?: hormetic and redox perspectives. *J. Med. Life* 4 (4), 346–351.
- García-Capdevila, S., Portell-Cortés, I., Torras-García, M., Coll-Andreu, M., Costa-Miserachs, D., 2009. Effects of long-term voluntary exercise on learning and memory processes: dependency of the task and level of exercise. *Behav. Brain Res.* 202 (2), 162–170.
- Grippe, A.J., Lamb, D.G., Carter, C.S., Porges, S.W., 2007. Social isolation disrupts autonomic regulation of the heart and influences negative affective behaviors. *Biol. Psychiatry* 62 (10), 1162–1170.
- Grubisha, O., Smith, B.C., Denu, J.M., 2005. Small molecule regulation of Sir2 protein deacetylases. *FEBS J.* 12, 51–62.
- Gurd, B.J., Peters, S.J., Heigenhauser, G.J., LeBlanc, P.J., Doherty, T.J., Paterson, D.H., Kowalchuk, J.M., 2008. O₂ uptake kinetics, pyruvate dehydrogenase activity, and muscle deoxygenation in young and older adults during the transition to moderate-intensity exercise. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294 (2), R577–R584.
- Haigis, M.C., Guarente, L.P., 2006. Mammalian sirtuins—emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev.* 20 (21), 2913–2921.
- Haskell, W.L., Lee, I.M., Pate, R.R., Powell, K.E., Blair, S.N., Franklin, B.A., Macera, C.A., Heath, G.W., Thompson, P.D., Bauman, A., 2007. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med. Sci. Sports Exerc.* 39 (8), 1423–1434.
- Koltai, E., Szabo, Z., Atalay, M., Boldogh, I., Naito, H., Goto, S., Nyakas, C., Radak, Z., 2010. Exercise alters SIRT1, SIRT6, NAD and NAMPT levels in skeletal muscle of aged rats. *Mech. Ageing Dev.* 131 (1), 21–28.
- Koltai, E., Hart, N., Taylor, A.W., Goto, S., Ngo, J.K., Davies, K.J.A., Radak, Z., 2012. Age-associated declines in mitochondrial biogenesis and protein quality control factors are minimized by exercise training. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00337.2011>.
- Koopman, R., 2011. Dietary protein and exercise training in ageing. *Proc. Nutr. Soc.* 70 (1), 104–113.
- Kramer, A.F., Erickson, K.I., Colcombe, S.J., 2006. Exercise, cognition, and the aging brain. *J. Appl. Physiol.* 101 (4), 1237–1242.
- Kwon, H.S., Ott, M., 2008. The ups and downs of SIRT1. *Trends Biochem. Sci.* 33 (11), 517–525.
- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P., Auwerx, J., 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* 127 (6), 1109–1122.
- Lanza, J.F., Sanchez-Roige, S., Gagliano, H., Fuentes, S., Bayod, S., Camins, A., Pallàs, M., Armario, A., Escorihuela, R.M., 2012. Physiological and behavioural consequences of long-term moderate treadmill exercise. *Psychoneuroendocrinology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.03.008>.
- Lappalainen, Z., 2011. Sirtuins: a family of proteins with implications for human performance and exercise physiology. *Res. Sports Med.* 19, 53–65.
- Leasure, J.L., Jones, M., 2008. Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. *Neuroscience* 156 (3), 456–465.
- Liu, C.T., Brooks, G.A., 2012. Mild heat stress induces mitochondrial biogenesis in C2C12 myotubes. *J. Appl. Physiol.* 112 (3), 354–361.
- Liu, D., Pitta, M., Mattson, M.P., 2008. Preventing NAD(+) depletion protects neurons against excitotoxicity: bioenergetic effects of mild mitochondrial uncoupling and caloric restriction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1147, 275–282.
- Ljubicic, V., Hood, D.A., 2008. Kinase-specific responsiveness to incremental contractile activity in skeletal muscle with low and high mitochondrial content. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295 (1), E195–E204.
- Ljubicic, V., Joseph, A.M., Saleem, A., Uguccioni, G., Collu-Marchese, M., Lai, R.Y., Nguyen, L.M., Hood, D.A., 2008. Transcriptional and post-transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: effects of exercise and aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1800 (3), 223–234.
- Longo, V.D., 2009. Linking sirtuins, IGF-I signaling, and starvation. *Exp. Gerontol.* 44, 70–74.
- Malek, M.H., Olfert, I.M., Esposito, F., 2010. Detraining losses of skeletal muscle capillarization are associated with vascular endothelial growth factor protein expression in rats. *Exp. Physiol.* 95 (2), 359–368.
- Marchi, S., Giorgi, C., Suski, J.M., Agnoletto, C., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E., Missiroli, S., Patergnani, S., Poletti, F., Rimessi, A., Duszynski, J., Wieckowski, M.R., Pinton, P., 2012. Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging. *J. Signal Transduct.* 2012, 329635.
- Martinez, D.G., Nicolau, J.C., Lage, R.L., Toschi-Dias, E., de Matos, L.D., Alves, M.J., Trombetta, I.C., Dias da Silva, V.J., Middlekauff, H.R., Negrão, C.E., Rondon, M.U., 2011. Effects of long-term exercise training on autonomic control in myocardial infarction patients. *Hypertension* 58 (6), 1049–1056.
- Mirochnic, S., Wolf, S., Staufenbiel, M., Kempermann, G., 2009. Age effects on the regulation of adult hippocampal neurogenesis by physical activity and environmental enrichment in the APP23 mouse model of Alzheimer disease. *Hippocampus* 19 (10), 1008–1018.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170–3175.
- Nisoli, E., Tonello, C., Cardile, A., Cozzi, V., Bracale, R., Tedesco, L., Falcone, S., Valerio, A., Cantoni, O., Clementi, E., Moncada, S., Carruba, M.O., 2005. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* 310, 314–331.
- Pagliarini, D.J., Calvo, S.E., Chang, B., Sheth, S.A., Vafai, S.B., Ong, S.E., Walford, G.A., Sugiana, C., Boneh, A., Chen, W.K., Hill, D.E., Vidal, M., Evans, J.G., Thorburn, D.R., Carr, S.A., Mootha, V.K., 2008. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* 134, 112–123.
- Pardo, P.S., Mohamed, J.S., Lopez, M.A., Boriek, A.M., 2011. Induction of Sirt1 by mechanical stretch of skeletal muscle through the early response factor EGR1 triggers an antioxidant response. *J. Biol. Chem.* 286 (4), 2559–2566.
- Pasini, E., Le Douarin Lahaye, S., Flati, V., Assanelli, D., Corsetti, G., Specia, S., Bernabei, R., Calvani, R., Marzetti, E., 2012. Effects of treadmill exercise and training frequency on anabolic signaling pathways in the skeletal muscle of aged rats. *Exp. Gerontol.* 47 (1), 23–28.

- Philp, A., Chen, A., Lan, D., Meyer, G.A., Murphy, A.N., Knapp, A.E., Olfert, I.M., McCurdy, C.E., Marcotte, G.R., Hogan, M.C., Baar, K., Schenk, S., 2011. Sirtuin 1 (SIRT1) deacetylase activity is not required for mitochondrial biogenesis or peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha) deacetylation following endurance exercise. *J. Biol. Chem.* 286 (35), 30561–30570. 2.
- Radak, Z., Chung, H.Y., Koltai, E., Taylor, A.W., Goto, S., 2008a. Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res. Rev.* 7 (1), 34–42.
- Radak, Z., Chung, H.Y., Goto, S., 2008b. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic. Biol. Med.* 44 (2), 153–159. 15.
- Rinaldi, B., Corbi, G., Boccuti, S., Filipelli, A., Rengo, G., Leosco, D., Rossi, F., Filipelli, A., Ferrara, N., 2006. Exercise training affects age-induced changes in SOD and heat shock protein expression in rat heart. *Exp. Gerontol.* 41, 764–770.
- Ristow, M., Schmeisser, S., 2011. Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 51 (2), 327–336.
- Ristow, M., Zarse, K., 2010. How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: the concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Exp. Gerontol.* 45 (6), 410–418.
- Roden, M., 2012. Exercise in type 2 diabetes: to resist or to endure? *Diabetologia* 55 (5), 1235–1239.
- Rolland, T., Abellan van Kan, G., Vellas, B., 2010. Healthy brain aging: role of exercise and physical activity. *Clin. Geriatr. Med.* 26 (1), 75–78.
- Skokowa, J., Lan, D., Thakur, B.K., Wang, F., Gupta, K., Cario, G., Brechlin, A.M., Schambach, A., Hinrichsen, L., Meyer, G., Gaestel, M., Stanulla, M., Tong, Q., Welte, K., 2009. NAMPT is essential for the G-CSF-induced myeloid differentiation via a NAD(+)–sirtuin-1-dependent pathway. *Nat. Med.* 15 (2), 151–158.
- Slentz, C.A., Bateman, L.A., Willis, L.H., Shields, A.T., Tanner, C.J., Piner, L.W., Hawk, V.H., Muehlbauer, M.J., Samsa, G.P., Nelson, R.C., Huffman, K.M., Bales, C.W., Houmard, J.A., Kraus, W.E., 2011. Effects of aerobic vs. resistance training on visceral and liver fat stores, liver enzymes, and insulin resistance by HOMA in overweight adults from STRRIDE AT/RT. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301 (5), E1033–E1039.
- Stranahan, A.M., Zhou, Y., Martin, B., Maudsley, S., 2009. Pharmacomimetics of exercise: novel approaches for hippocampally-targeted neuroprotective agents. *Curr. Med. Chem.* 16 (35), 4668–4678.
- Suwa, M., Nakano, H., Radak, Z., Kumagai, S., 2008. Endurance exercise increases the SIRT1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha protein expressions in rat skeletal muscle. *Metabolism* 57 (7), 986–998.
- Uda, M., Ishido, M., Kami, K., Masuhara, M., 2006. Effects of chronic treadmill running on neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus of adult rat. *Brain Res.* 1104 (1), 64–72.
- van Praag, H., 2009. Exercise and the brain: something to chew on. *Trends Neurosci.* 32 (5), 283–290.
- Vega-Naredo, I., Caballero, B., Sierra, V., García-Macia, M., de Gonzalo-Calvo, D., Oliveira, P.J., Rodríguez-Colunga, M.J., Coto-Montes, A., 2012. Melatonin modulates autophagy through a redox-mediated action in female Syrian hamster Harderian gland controlling cell types and gland activity. *J. Pineal Res.* 52 (1), 80–92.
- Winter, B., Breitenstein, C., Mooren, F.C., Voelker, K., Fobker, M., Lechtermann, A., Krueger, K., Fromme, A., Korsukewitz, C., Floel, A., Knecht, S., 2007. High impact running improves learning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 87 (4), 597–609.

Publicació 3

**AUTOPHAGIC PROCESSES WERE DIFFERENTIALLY
MODULATED BY LONG-TERM MODERATE EXERCISE
IN RAT BRAIN AND PERIPHERAL TISSUES**

Bayod S, Del Valle J, Pelegrí C, Vilaplana J, Canudas AM, Camins A, Jiménez A,
Sanchez-Roige S, Lalanza JF, Escorihuela RM, Pallàs M

En avaluació al Mechanisms of ageing and development (2013)

Un estil de vida saludable, on la pràctica d'exercici físic hi és present, millora diferents aspectes relacionats amb el deteriorament cognitiu i fisiològic associat a l'envelliment. Cal dir però, que els mecanismes moleculars implicats no estan ben definits. Les cèl·lules eucariotes disposen de dos mecanismes de degradació, el proteosoma (UPS) i l'autofàgia. Ambdós tenen la capacitat d'eliminar proteïnes defectuoses i que són ubiquitinitzades, però sols l'autofàgia pot eliminar orgànuls sencers i microorganismes. Així, durant l'envelliment, es produeix un deteriorament d'aquests mecanismes, conduint a l'acumulació de macromolècules i orgànuls defectuosos. Aquests fets alteraran el correcte funcionament cel·lular, i per tant, s'augmenta el risc de patir diferents malalties associades a l'envelliment, com les malalties neurodegeneratives. El mecanisme d'autofàgia, concretament la macroautofàgia, comprèn diferents etapes, la qual s'inicia amb la formació del fagòfor i finalitza amb la digestió dels elements a eliminar pels lisosomes. En aquest procés participen diferents elements: mTOR, Beclina 1, p62, LC3B-II, intervindrien més en les primeres etapes, mentre que LAMP1 ho faria al final del procés.

Es va estudiar en rates adultes a nivell cerebral (hipocamp i còrtex cerebral) i també a nivell perifèric (múscul esquelètic, fetge i cor) el procés d'autofàgia, concretament la macroautofàgia, determinant els nivells de proteïnes ubiquitinitzades i diferents elements que participen en aquest mecanisme; mesurant possibles canvis com a conseqüència de l'envelliment per una banda, i per l'altra, dels efectes de la pràctica d'exercici físic moderat de llarga durada i de la simple manipulació dels animals.

Amb l'edat, es va observar un increment dels nivells de proteïnes ubiquitinitzades tant a nivell cerebral com a nivell perifèric (excepte en cor), on l'exercici els va reduir de manera exclusiva en el còrtex. Aquest fet estaria relacionat amb la inhibició de l'autofàgia produïda en el còrtex del grup de rates sedentàries, caracteritzada per un augment dels nivells d'mTOR fosforilada i una disminució de Beclina 1. La pràctica d'exercici físic (i també la manipulació dels animals) va revertir aquests nivells, on també van augmentar els d'LC3B-II. LAMP1 també es va incrementar, això si, de manera més accentuada en el grup d'animals entrenats. A nivell hepàtic també es van determinar canvis en el procés d'autofàgia amb l'exercici, on els nivells d'mTOR fosforilat i p62 van augmentar.

Per tant, l'exercici físic activa el procés d'autofàgia a nivell del còrtex cerebral reduint els nivells de proteïnes ubiquitinitzades, participant així en el manteniment de l'homeòstasi i la supervivència neuronal. D'altra banda, els canvis determinats en el fetge, podrien contribuir de manera beneficiosa disminuint el contingut lipídic en aquest òrgan.

Macroautophagic process were differentially modulated by long-term moderate exercise in rat brain and peripheral tissues

S. Bayod^{1,2}, J. del Valle^{1,2,4}, C. Pelegri^{1,2}, J. Vilaplana^{1,2}, A.M. Canudas^{1,2}, A. Camins, A. Jiménez³, S. Sanchez-Roige³, J.F. Lalanza³, R.M. Escorihuela³ and M. Pallàs^{1,2}

¹Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia. Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona. Nucli Universitari de Pedralbes. 08028 Barcelona. Spain.

²Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED).

³Dept de Psiquiatria i Medicina Legal, Institut de Neurociències, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain.

⁴Grup de Neuroplasticitat i Regeneració, Institut de Neurociències i Departament de Biologia Cel•lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra, Spain.

Corresponding author:

Mercè Pallàs, PhD.

Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia

Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, E-08028 Barcelona, Spain

e-mail: pallas@ub.edu

ABSTRACT

The autophagic process, which is a lysosomal degradation pathway, is activated during stress, starvation or exercise. Exercise has beneficial effects on human health, including neuroprotection. However, the cellular mechanisms underlying these effects are incompletely understood. Endurance and intense exercise induces autophagy in peripheral tissues, but little is known about the effect of long-term moderate exercise or animal handling on autophagy and its role in brain and peripheral tissues. To investigate the capacity of exercise-mediated macroautophagy in vivo in a moderate exercise model we determined mTOR activation, as well as expression of the autophagic proteins Beclin 1 and LC3B-II, the lysosomal proteins p62 and LAMP1 and the ubiquitinated proteins. Long-term exercise induced autophagy in the cortex by inactivation of mTOR. There was an increase in Beclin 1, LC3B-II and LAMP1. Moreover, there was a reduction in ubiquitinated proteins. It is noteworthy to say that some of these changes are also present in handled rats. p62 was only increased in the hippocampus, but no significant changes in the autophagic pathway were found in this brain area. No specific or significant changes were found in skeletal and cardiac muscle. In the liver of long-term exercised rats there was an increase in mTOR phosphorylation and its substrates, phosphorylated p70S6K and p62, but not in Beclin 1 and LC3B-II proteins, the phagophore formers. Thus, exercise induces autophagy specifically in the cortex through lysosomal and proteosomal activity increase. No significant changes were associated with long-term moderate exercise in liver, muscle or heart.

Keywords: exercise, cortex, hippocampus, autophagy, proteasome

1. INTRODUCTION

Lifestyle factors such as exercise, diet and nutrition are increasingly recognized as determinants of successful aging. Participation in recreational physical activity is correlated with a reduced risk of dementia in elderly humans. Running also enhances learning and memory in healthy adults (Stranahan et al., 2009). The cellular and molecular mechanisms underlying exercise-induced changes in brain function are currently being characterized in several rodent models (Stranahan et al., 2009; Stranahan et al., 2006).

Clinical knowledge of the past two decades has recognized the beneficial effects of exercise in lowering hyperglycemia, hypercholesterolemia and hypertension. Consequently, exercise has been regularly prescribed as part of treatment for diabetes, hypertension, and cardiovascular disease, and to lower the risk of metabolic syndrome and neurodegenerative diseases (Christensen et al., 2011; Penedo and Dahn, 2005). Exercise is known to have beneficial effects on the organism, and increasing evidence helps us to understand how it works at molecular and cellular level. Overall, exercise and its molecular/cellular consequences are consistent with longevity assurance pathways and life extension interventions (Boveris and Navarro, 2008).

Autophagy is an intracellular catabolic process involved in protein and organelle degradation via the lysosomal pathway (Salminen and Kaarniranta, 2009). There are various types of autophagy that differ in how the cytoplasmic material is delivered into the lysosome, being the macroautophagy the most investigated type of autophagy (hereafter referred to as autophagy). In this process, isolation membranes/phagophores engulf a portion of the cytoplasm by double membrane

vesicles, called autophagosomes, which finally deliver their contents to the lysosomes for degrading. This process constitutively takes place at lower levels in most cells, but is stimulated markedly under some pathophysiological and pathological conditions, such as starvation (Komatsu and Ichimura, 2010). However, the functional efficiency of the autophagic-lysosomal system clearly declines during aging, which compromises the maintenance of a healthy cell and can lead to certain proteinopathies and neurodegeneration that are typical of aging (Rezzani et al., 2012). Several studies have demonstrated that enhancing autophagic degradation, for example with rapamycin and trehalose, can have therapeutic potential in experimental models of protein aggregation diseases, such as Huntington's (Ravikumar et al., 2004) and Parkinson's (Sarkar et al., 2007).

The signalling pathways that regulate autophagy and the aging process are linked at molecular level. In particular, the repressive effects of the mammalian target of rapamycin (mTOR) and its modulation by AMP-activated protein kinase α (AMPK α), as well as the role of autophagy-related Bcl-2-interacting Atg6 homolog (Beclin 1) and the microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3-II) have been found to be closely related to the autophagic process (Rezzani et al., 2012; Salminen and Kaarniranta, 2009). Mammalian sequestosome 1 (SQSTM1), named p62, is also related to autophagy (Johansen and Lamark, 2011; Nezis and Stenmark, 2012). It is known that p62 and LAMP1 levels are indicative of lysosomal degradation of autophagosome (Bjørkøy 2009, 2005). Moreover, p62 has a pivotal role in the proteasomal degradation of ubiquitinated proteins, reducing artifactual protein aggregates into the cell (Nezis et al., 2012).

Recently, we demonstrated that long-term moderate exercise leads to neuroprotection through sirtuin 1 and mechanisms that regulate its activity (Bayod et al., 2011). There is a growing interest in the relationship between the activation of sirtuin 1 and the onset of autophagic processes, particularly in the role of sirtuin 1 in increasing levels of autophagic proteins and its involvement in the AMPK α -mTOR axis (Morselli et al., 2010). Recent findings provide new insights into the molecular signals in a single bout of exercise versus regular exercise in humans (Hopkins et al., 2012). The goal of this study is to examine the effects of long-term moderate exercise on macroautophagic markers in the brain and peripheral tissues in rat, to establish a relationship among autophagic processes as an additional mediators of exercise effects, previously demonstrated after long-term moderate exercise in brain and peripheral tissues (Bayod et al., 2011; Lanza et al., 2012; Bayod et al., 2012).

2. EXPERIMENTAL PROCEDURES

2.1. Animals and exercise schedule

The exercise protocol was described in earlier reports (Bayod et al., 2011; Lanza et al., 2012). Twenty-nine male Sprague-Dawley rats aged 5 weeks at the beginning of the experiment were semi-randomly distributed into three experimental groups: exercised (EXE; n=12), control (NoEXE; n=9) and sedentary (SED; n=8). At the end of the experiment rats are 10 months old. Eight-weeks-old male rats (YOUNG; n=6) were also killed on the same day in order to include young controls in the analysis. After isoflurane anesthesia, the animals were killed by decapitation between 9:00 h and

12:00 h. The brain was immediately removed, and dissected into cortex and hippocampus; the liver, heart and soleus muscle were extracted and frozen in powdered dry ice. All tissues were maintained at -80°C until use. In addition, four brains from each group were processed for immunohistochemical analysis. Briefly, the tissue was fixed in methacarn and processed for paraffin-embedded immunohistochemistry. The experimental protocol was approved by the *Ethics Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona* and complied with 'Principles of laboratory animal care' and the European Communities Council Directive (86/609/EEC).

2.2. Exercise regime

A treadmill consisting of three parallel runways (45 cm long, 11cm wide and 12cm deep) was used. The apparatus was placed at an inclination of 0° in the cage. On the first day, the rats were placed in the treadmill for 30 min without running in order to become habituated to the apparatus and to diminish subsequent exercise-induced stress. Exercise sessions were conducted between 13:30 h and 16:30 h, 4-5 days per week for 36 weeks. Neither electrical shock nor physical prodding was used to force training. For the EXE group, the treadmill started at a speed of 4.2 m/min, and increased progressively by 1 m/min every 30 sec to a speed of 12 m/min (which was reached between minute 3 to 12). NoEXE rats were placed individually on another treadmill (0 m/s) for the same number of sessions and the same duration as the EXE group. Thus control and exercised rats were handled in the same manner and spent the same amount of time out of the home cage. The SED group was handled once a week for cage cleaning and tail marking.

2.3. Protein immunodetection experiments

Aliquots of homogenized protein containing 20 µg per sample were analyzed by Western blot. The protein samples were separated by SDS–PAGE (8–18%) and transferred to PVDF membranes (Millipore). The membranes were blocked in 5% non-fat milk in TBS containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) for 1 h at room temperature, followed by an overnight incubation at 4°C with antibodies against LC3B (1:2000; Cell Signaling), Beclin 1 (1:1000 for Western blot; 1:100 for co-immunoprecipitation; Abcam), p-mTOR (Ser2481) and mTOR (1:500 and 1:1000 respectively; Millipore), p62 (1:1000; Abcam), Ubiquitin (1:500; Leica), LAMP1 (1:1000; GeneTex), p-p70S6K (Thr389) and p70S6K (1:1000 both; Cell Signaling), Bcl-2 (1:1000; Cell Signaling), GADPH (1:2000; Millipore) and β-actin (1:20000; Sigma). Membranes were then washed and incubated with secondary antibodies for 1 h at room temperature. Immunoreactive protein was viewed with a chemiluminescence-based detection kit, following the manufacturer's protocol (ECL kit; Millipore) and digital images were acquired using a ChemiDoc XRS+ System (BioRad). Semiquantitative analyses were carried out using Image Lab software (BioRad) and the results were expressed in arbitrary units. Protein loading was routinely monitored by phenol red staining of the membrane or by immunodetection of β-actin or GADPH.

2.4. Immunohistochemical analysis

Tissue samples were deparaffinized in xylene and rehydrated through a descending ethanol gradient (100%, 95% and 80%), 3 min in each solution. Afterwards, the brain sections were rinsed in PBS before quenching of endogenous peroxidase activity with

PBS containing 0.3% H₂O₂ and 10% methanol, for 15 min at room temperature in the dark. After washing in PBS for 3 x 5 min and in PBS containing 0.5% Triton X-100 for 3 x 5 min, the tissues were blocked with 0.2% (w/v) gelatin in PBS containing 3% fetal bovine serum (FBS), 0.5% Triton, 0.2% bovine serum albumin (BSA) and 0.2% sodium azide for 1 h at room temperature in a humidified chamber. They were then washed for 3 x 5 min in PBS-Triton and incubated with the primary antibody (see below) diluted in the same buffer used in the blocking step, overnight at 4°C. After washing in PBS-Triton for 3 x 5 min, the brain sections were incubated with biotinylated secondary antibody (see below) diluted in 0.2% (w/v) gelatin in PBS containing 1% FBS, 0.1% Triton and 0.2% BSA for 2 h at room temperature in a humidified chamber. Tissues were washed in PBS-Triton for 3 x 5 min and incubated with ABC reagent (see below) for 90 min at room temperature in a humidified chamber. After washing in PBS-Triton for 2 x 5 min and PB for 2 x 5 min, the brain sections were incubated in peroxidase substrate solution (PB containing 0.05% 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) and 0.005% H₂O₂) until optimal color developed at room temperature. Finally, slides were washed for 3 x 5 min in PB, dehydrated through an ascending ethanol gradient (70%, 90% and 100%) and xylene, 3 min in each solution, and mounted in DPX, then allowed to dry overnight at room temperature. Images were taken with a microscope (BX41, Olympus, Germany) at 40x magnification.

We used rabbit polyclonal anti-LC3B (1:200; CellSignaling) as the primary antibody, goat anti-rabbit IgG–Biotin (1:200; Sigma) as the secondary antibody and VECTASTAIN® Elite ABC reagent (1:100; Vector Laboratories).

2.5. Data analysis

The results are expressed as the mean \pm SEM. from at least five to six samples. In all cases, data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc Tukey–Kramer multiple-comparison tests. P values lower than 0.05 were considered significant.

3. RESULTS

Determination of mTOR, an inhibitor of the autophagic process, showed that the active form of this factor (p-mTOR in Ser2481) was significantly higher in the cortex of SED animals than in YOUNG, EXE or NoEXE animals (Fig. 1A). We studied the direct substrate phosphorylated by mTOR, p70S6K. However, we found no changes in the phosphorylated levels of this protein in cortex (Fig. 1B). Interestingly, in hippocampus there were no significant variations in the levels of phosphorylated mTOR or p70S6K in the different groups studied (Fig. 1C and 1D).

Beclin 1 expression was higher in cortex of EXE and NoEXE animals than in SED rats (Fig. 2A). The increases reached levels similar to YOUNG animals. Conversely, no changes were observed in hippocampus for Beclin 1 (Fig. 3A).

LC3B is another of the proteins that are considered key in the autophagy activation process. We determined the LC3B-II fragment as a measure of the autophagic process. In this case, no differences were found between young and adult animals in the cortex (Fig. 2B), but expression of the LC3B-II fragment was higher in EXE and NoEXE animals than in SED. Immunohistochemical analysis demonstrated a higher number of punctated cells in EXE animals compared with SED rats, reinforcing WB results. No differences were observed among the hippocampus of EXE, NoEXE and SED rats (Fig. 3B).

LAMP1 is a lysosomal marker necessary for the autophagolysosome formation and homologue of LAMP2. We found significantly higher expression of this protein in the cortex of EXE rats (Fig. 2C) than in SED and NoEXE animals, whereas in hippocampus a significant decrease in LAMP1 was found in all adult groups (SED, NoEXE and EXE) (Fig. 3C). No changes in p62, a protein implicated in autophagosome generation, were found in cortex (Fig 4A). However, p62 expression was significantly higher in hippocampus of EXE rats than in the SED, NoEXE and YOUNG groups (Fig 4C). As p62 is also linked to proteasomal activity, we determined protein polyubiquitylation. We found that the expression of ubiquitinated proteins was significantly lower in the cortex of EXE animals than in NoEXE or SED rats, reaching levels similar to YOUNG animals (Fig. 4B). It could be said that this effect of exercise is specific to the cortex, because the higher levels of ubiquitinated proteins observed in the hippocampus of all adult groups was not reverted by the exercise (Fig. 4D).

To determine whether the effects of exercise or animal handling are specific to brain areas, we studied other non-neuronal tissues from the same rats. mTOR and p70S6K phosphorylated levels were not modified in muscle among experimental groups (Fig. 6A and B). In heart, phosphorylated mTOR levels were not altered, but phosphorylated p70S6K was lower in adult rats than in the YOUNG group (Fig. S1A and S1B). Conversely, higher activation of mTOR was observed in liver of NoEXE and EXE animals than in SED rats, probably due to the metabolic role of this tissue (Fig. 5A). However, in EXE rats only, p70S6K was phosphorylated to a higher extent than in the other experimental groups (Fig. 5B). No significant changes were found in the levels and activation of Beclin 1 and LC3B respectively (Fig. 5C and 5D), whereas a reduction in

LAMP1 was found in liver of all adult groups (Fig. 5E). In muscle, the levels of Beclin 1 and LC3B-II (Fig. 6C and 6D) remained unchanged in the different experimental groups, but we observed an increase in LAMP1 only in the EXE group (Fig. 6E). Different results were found for p62. In muscle, p62 was significantly higher in adult rats than in YOUNG animals (Fig. 7C), while in liver, p62 expression was higher in EXE rats than in the other experimental groups (Fig. 7A). No one peripheral tissue showed changes in polyubiquitinated proteins, apart from higher levels in adult rats than in YOUNG ones in liver and muscle (Fig. 7B and 7D), with no changes in heart (Fig. S2B).

4. DISCUSSION

The autophagy-lysosome pathway and ubiquitin–proteasomal system (UPS) are the main systems responsible for the digestion of most cytosolic and aggregated or misfolded proteins in the cells (Shintani and Klionsky, 2004). The UPS selectively degrades the short-lived misfolded proteins limited in cells (Ciechanover, 2005). In contrast, autophagy is less selective and contributes to the degradation of long-lived proteins and damaged intracellular (such as mitochondria) and even extracellular organelles (Levine and Klionsky, 2004). However, evidence gathered in recent years has shown interplay between these two mechanisms, as ubiquitylation can target substrates for degradation via both pathways (Korolchuk et al., 2010).

Therefore, autophagy is fundamental for cell homeostasis as it removes aged and prone-to-aggregation, potentially damaged proteins and provides macromolecules for further synthesis. Many neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's, are characterized by the formation of intracellular protein

aggregates in affected brain regions. These protein deposits are composed of ubiquitin conjugates, which suggests a failure in the protein degradation system (McCray and Taylor, 2008; Yamamoto and Simonsen, 2011). Moreover, the function of autophagy declines with aging and could determine both cell and individual lifespans (Cuervo et al., 2005).

In humans, an acute, single bout of exercise did not affect memory, but regular physical exercise enhanced recognition memory and decreased stress, and these effects are linked to an increase in brain-derived neurotrophic factor-Val (BDNF-Val) (Hopkins et al., 2012). Accordingly, in previous reports, we demonstrated that long-term moderate exercise induces an increase in sirtuin 1 and AMPK α activity in rat tissues. In brain areas of adult rats, these effects were translated to neuroprotection, through a reduction in tau phosphorylation, an increase in synaptophysin, which is a marker of synaptic terminals, and an increase in mitochondrial biogenesis in cortex and hippocampus of EXE, and in some cases NoEXE rats (Bayod et al. 2011). In peripheral tissues, we found changes in sirtuin 1 and a reduction in oxidative stress parameters in muscle and liver, but not in heart. No robust changes were found in mitochondrial function in these tissues (Bayod et al., 2012).

On the basis of these results, and particularly the activation of sirtuin 1 in all tissues induced by long-term exercise, we aimed to study related signals such as mTOR and the autophagy process under the same exercise regime. Several authors have demonstrated that inhibition of mTOR extends lifespan in mice, can slow or block Alzheimer's disease progression in a transgenic mouse model of the disease, and reduces neuronal damage in several models of neurodegeneration (Carloni et al.,

2010; Spilman et al., 2010; Tizon et al., 2010; Zheng et al., 2010). For this reason, the mTOR inhibitor rapamycin, which has already been used in clinical settings, has been postulated as a potentially effective therapeutic agent for the treatment of cognitive impairment linked to aging or Alzheimer's disease. The search for long-life strategies that avoid the adverse effects of drugs such as rapamycin is one of the reasons for including physical exercise in the modern lifestyle. Physical exercise may help to minimize the use of pharmacological strategies for reducing the deleterious effects of age in the brain.

It has been stated that AMPK α activation decreases mTOR signalling, which facilitates autophagy and promotes lysosomal degradation (Cai et al., 2012; Jamart et al., 2012). Previously, we demonstrated an increase in AMPK α phosphorylation in rat brain after long-term exercise (Bayod et al., 2011). Here, we found that mTOR phosphorylation was significantly reduced in cortex of exercised (EXE) or handled animals (NoEXE), but no changes were observed in hippocampus. Accordingly, we presented evidence that autophagy is selectively induced in cortex of EXE and NoEXE rats, but not in other neuronal tissues (hippocampus). Increased expression of Beclin 1 and an active form of LC3B, as phagophore formers, together with an increase in LAMP1 exclusively in exercised animals but not in NoEXE rats, were indicative of an active autophagic process. To date, there has been no evidence that animals undergoing regular and long-term exercise develop an autophagic process in brain areas. Bcl-2 protein has been reported to be involved in autophagy, possibly through interaction with the autophagic protein Beclin 1 via its BH3 domain, and it is known that one of the mTOR-independent autophagy pathways act through loosening the Beclin1-Bcl-2 interaction

(Maiuri et al., 2007; Wang, 2008; He et al., 2012a). We found any changes neither in the Bcl-2 protein levels nor in the interaction between Bcl-2 and Beclin 1 determined by co-immunoprecipitation (data not shown).

p62 protein can bind to ubiquitinated proteins and control their aggregation and degradation via either autophagy or proteasomal activity. This protein has been reported in association with intracellular inclusions such as tauopathies, α -synucleinopathies and other neurodegenerative brain disorders involving inclusions with misfolded proteins. Here, no differences in p62 expression were observed in cortex with age, although a significant reduction in polyubiquitinated proteins was found in this brain area, exclusively in EXE animals, not in NoEXE rats. In contrast, an increase of p62 was observed in the hippocampus of all adult groups, probably because intracellular inclusions form earlier in this brain area than in the cortex with aging (Delacourte et al., 2002).

In fact, we published that phosphorylated tau levels decrease after long-term exercise (Bayod et al., 2011), which could be related to greater removal of intracellular inclusions by lysosomal activity. Proteasome-mediated proteolysis by p62/SQSTM1 is reported to be the final outcome of protein polyubiquitylation. In our model, we observed an increase in ubiquitinated proteins with age, both in cortex and hippocampus. This is an age-related phenomenon that only improved in the cortex with exercise. The decrease of ubiquitinated proteins in the cortex of EXE rats could be related with the increased levels of the lysosomal protein LAMP1 observed in this group, while a lack of effect by handling (NoEXE group) was established above both LAMP1 and ubiquitinated protein levels. Impairment of autophagy is accompanied by

accumulation of p62 (Klionsky et al., 2012), which leads to the formation of large aggregates, including p62 and ubiquitin, in neurons and hepatocytes (Komatsu et al., 2007). In reference to this fact, higher levels of p62 and a decrease in LAMP1, and consequently higher levels of polyubiquitinated proteins, were observed in the hippocampus of all adult groups.

The fact that increased autophagy was only observed in cortex and that we did not find any cognitive changes after long-term exercise in Lanza and coworkers (2012) indicate that the autophagy mechanism is probably activated by modifications in the motor cortex and is unlikely to be related with cognition or memory. However, we cannot reject the possibility that other lysosomal or proteasome activity is activated by exercise in hippocampus. Recently, it has been demonstrated that a single bout of exercise induces autophagy in the cerebral cortex, but not in whole brain extracts (He et al., 2012a). In this report, LC3B was not modified, but there was a reduction in p62/SQSTM1. The authors related the trigger of autophagic machinery with AMPK and sirtuin 1 pathways induced by exercise, as both of these factors function as positive regulators of autophagy (Morselli et al., 2010).

In reference to peripheral tissues, long-term moderate exercise did not induce any changes in mTOR activation by phosphorylation or in autophagic proteins such as Beclin-1, LCB and p62 in muscle or heart, although it has been described an activation of autophagy and ubiquitin-proteasome pathways in skeletal muscle during endurance running (Jamart et al., 2012). In liver, an essentially metabolic tissue, results showed an increase in mTOR activation in both EXE and NoEXE groups. A recent study showed that inactivation of mTOR and an increase in LC3B-II was induced after 0.5-1 h of a

single bout of running exercise in heart, but to a lesser extent after 3 h (Ogura et al., 2011). He and coworkers (2012b) demonstrated that a single bout of exercise induces autophagic processes mediated by Bcl-2, but not basal autophagy in peripheral tissues, particularly those with higher metabolic activity such as muscle, liver or pancreas (He et al., 2012a). In rats, we found no changes after a very different form of exercise (aerobic and moderate) over a long period of time; longer than the activation of mTOR in liver.

As mentioned above, in liver there is an increase in activation of mTOR in EXE and NoEXE rats, which is related to the higher levels of phosphorylated p70S6K observed in the exercise group only. However, this is not translated into changes in the autophagic process in this tissue. mTOR activation in liver could be linked to metabolic processes inside hepatocytes, rather than removal of misfolded proteins. Conversely, as in hippocampus, higher expression of p62, but not of Beclin 1 or LCB, was determined in the liver of EXE animals. Therefore, in the liver, the mTOR activation and higher p62 protein levels observed in exercised rats, could be related with metabolic effects rather than the autophagy inhibition, regulating aspects such as the adipogenesis and energy control (Moscat and Diaz-Meco, 2011; Rodriguez et al., 2006; Yecies et al., 2011).

5. CONCLUSIONS

We conclude that moderate exercise, such as fast walking or slow running for a long period of time, induces changes in macroautophagic process mainly in the cortex,

which reinforce the neuroprotective role of exercise (increased neurogenesis, and decrease in neurodegenerative hallmarks) reported (Bayod et al., 2011). Such changes were not found in the hippocampus or in the other peripheral tissues studied, such as liver, muscle and heart. These results are in agreement with recent observations in mouse cortex, but not in whole brain, after a single bout of exercise (He et al., 2012a). Further studies should be carried out to clarify the beneficial role of moderate long-term exercise in the decline of autophagy during senescence.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Language Advisory Service of the University of Barcelona for revising the manuscript. This study was supported by grants SAF2012-39852, PSI2008-06417-C03-03 from the *Ministerio de Educación y Ciencia*, DPS2008-06998-C01, C02 from the *Instituto de Salud Carlos III*, 2009/SGR00893 from the *Generalitat de Catalunya* and 610RT0405 from the *Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo* (CYTED).

S.B. was supported by a predoctoral fellowship (APIF) from the University of Barcelona. J.F.L. was supported by a predoctoral fellowship from the *Generalitat de Catalunya* (FI-DGR 2011).

7. REFERENCE LIST

Bayod S, Del Valle J, Canudas AM, Lalanza JF, Sanchez-Roige S, et al. (2011) Long-term treadmill exercise induces neuroprotective molecular changes in rat brain. *J Appl Physiol* 111: 1380-1390.

Bayod S, Del Valle J, Lalanza JF, Sanchez-Roige S, de Luxán-Delgado B, et al. (2012) Long-term physical exercise induces changes in sirtuin 1 pathway and oxidative parameters in adult rat tissues. *Exp Gerontol* 47:925-935.

Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, et al. (2005) p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 171: 603-614.

Bjørkøy G, Lamark T, Pankiv S, Øvervatn A, Brech A, et al. (2009) Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol* 452:181-197.

Boveris A, Navarro A. (2008) Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. *Free Radic Biol Med* 15: 44 224-229.

Cai Z, Yan LJ Li K, Quazi SH, Zhao B. (2012) Roles of AMP-activated protein kinase in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 14:1-14.

Carlioni S, Girelli S, Scopa C, Buonocore G, Longini M, et al. (2010) Activation of autophagy and Akt/CREB signaling play an equivalent role in the neuroprotective effect of rapamycin in neonatal hypoxia-ischemia. *Autophagy* 6:366-377.

Christensen JR, Faber A, Ekner D, Overgaard K, Holtermann A, et al. (2011) Diet physical exercise and cognitive behavioral training as a combined workplace based intervention to reduce body weight and increase physical capacity in health care workers - a randomized controlled trial. *BMC Public Health* 11:671.

Ciechanover A. (2005) Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:79-87.

Cuervo AM, Bergamini E, Brunk U,T, Dröge W, French M, et al. (2005) Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. *Autophagy* 1:131-140.

Delacourte A, Sergeant N, Wattez A, Maurage C,A, Lebert F, et al. (2002) Tau aggregation in the hippocampal formation: an ageing or a pathological process? *Exp Gerontol* 37:1291-1296.

He C, Bassik MC, Moresi V, Sun K, Wei Y, et al. (2012a) Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature* 481:511-515.

He C, Sumpter R Jr, Levine B. (2012b) Exercise induces autophagy in peripheral tissues and in the brain. *Autophagy* 8:1548-1551.

Hopkins ME, Davis FC, VanTieghem MR, Whalen PJ, Bucci DJ. (2012) Differential effects of acute and regular physical exercise on cognition and affect. *Neuroscience* 215: 59-68.

Jamart C, Francaux M, Millet GY, Deldicque L, Frère D, et al. (2012) Modulation of autophagy and ubiquitin-proteasome pathways during ultra-endurance running. *J Appl Physiol* 112:1529-1537.

Johansen T, Lamark T. (2011) Selective autophagy mediated by autophagic adapter protein. *Autophagy* 7:279-296.

Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, et al. (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8(4):445-544.

Komatsu M, Ichimura Y. (2010) Selective autophagy regulates various cellular functions. *Genes Cells* 15:923-933.

Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, et al. (2007) Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 131: 1149-1163.

Korolchuk VI, Menzies FM, Rubinsztein DC. (2010) Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Lett* 584:1393-1398.

Lalanza JF, Sanchez-Roige S, Gagliano H, Fuentes S, Bayod S, et al. (2012) Physiological and behavioural consequences of long-term moderate treadmill exercise. *Psychoneuroendocrinology* 37(11):1745-54.

Levine B, Klionsky DJ. (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6:463-477.

Maiuri MC, Criollo A, Tasdemir E, Vicencio JM, Tajeddine N, et al. (2007) BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy* 3:374–376.

McCray BA, Taylor JP. (2008) The role of autophagy in age-related neurodegeneration. *Neurosignals* 16:75-84.

Morselli E, Maiuri MC, Markaki M, Megalou E, Pasparaki A, et al. (2010) The life span-prolonging effect of sirtuin-1 is mediated by autophagy. *Autophagy* 6:186-188.

Moscat J, Diaz-Meco MT. (2011) Feedback on fat: p62-mTORC1-autophagy connections. *Cell* 147:724-277.

Nezis IP, Stenmark H. (2012) p62 at the interface of autophagy oxidative stress signaling and cancer. *Antioxid Redox Signal* 17:786-793.

Ogura Y, Iemitsu M, Naito H, Kakigi R, Kakehashi C, et al. (2011) Single bout of running exercise changes LC3-II expression in rat cardiac muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 414:756-760.

Penedo J, Dahn JR. (2005) Exercise and well-being: a review of mental and physical health benefits associated with physical activity. *Curr Opin Psychiatry* 18:189-193.

Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, et al. (2004) Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 36:585-595.

Rezzani R, Stacchiotti A, Rodella LF. (2012) Morphological and biochemical studies on aging and autophagy. *Ageing Res Rev* 11:10-31.

Rodriguez A, Durán A, Selloum M, Champy MF, Diez-Guerra FJ, et al. (2006) Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62. *Cell Metab* 3(3):211-222.

Salminen A, Kaarniranta K. (2009) Regulation of the aging process by autophagy. *Trends Mol Med* 15:217-224.

Sarkar S, Davies JE, Huang Z, Tunnacliffe A, Rubinsztein DC. (2007) Trehalose a novel mTOR-independent autophagy enhancer accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 282:5641-5652.

Shintani T, Klionsky DJ. (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 306:990-995.

Spilman P, Podlitskaya N, Hart MJ, Debnath J, Gorostiza O, et al. (2010) Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 5 e9979.

Stranahan AM, Khalil D, Gould E. (2006) Social isolation delays the positive effects of running on adult neurogenesis. *Nat Neurosci* 9:526-533.

Stranahan AM, Lee K, Martin B, Maudsley S, Golden E, et al. (2009) Voluntary exercise and caloric restriction enhance hippocampal dendritic spine density and BDNF levels in diabetic mice. *Hippocampus* 19(10):951-961.

Tizon B, Sahoo S, Yu H, Gauthier S, Kumar AR, et al. (2010) Induction of autophagy by cystatin C: a mechanism that protects murine primary cortical neurons and neuronal cell lines. *PLoS One* 5 e9819.

Wang J. (2008) Beclin 1 bridges autophagy apoptosis and differentiation. *Autophagy* 4:947-948.

Yamamoto A, Simonsen A. (2011) The elimination of accumulated and aggregated proteins: a role for aggrephagy in neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 43:17-28.

Yecies JL, Manning BD. (2011) Transcriptional control of cellular metabolism by mTOR signaling. *Cancer Res* 71(8):2815-2820.

Zheng S, Clabough EB, Sarkar S, Futter M, Rubinsztein DC, et al. (2010) Deletion of the huntingtin polyglutamine stretch enhances neuronal autophagy and longevity in mice. *PLoS Genet* 6 e1000838.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: p-mTORSer²⁴⁸¹/mTOR activation and its phosphorylated substrate p70S6K protein levels in cortex (Fig. A and B) and hippocampus (Fig. 1C and D) for young (YOUNG), sedentary (SED), non-exercised (NoEXE) and exercised (EXE) rats. Images show representative Western blots and bar graphs obtained from semi-quantitative image analysis, as described in the Experimental Procedures. Results are mean \pm SEM of 6 independent experiments. *p<0.05 vs. SED; ^{\$\$}p<0.01 vs. YOUNG.

Figure 2: Beclin1, LC3-II and LAMP1 protein levels in cortex (Fig. 2A, B and C) for young (YOUNG), sedentary (SED), non-exercised (NoEXE) and exercised (EXE) rats. Images show representative Western blots and bar graphs obtained from semi-quantitative image analysis, as described in the Experimental Procedures. Results are mean \pm SEM of 6 independent experiments. *p<0.05, **p<0.01 vs. SED; #p<0.05 vs. NoEXE; \$p<0.05, ^{\$\$}p<0.01, ^{\$\$\$}p<0.001 vs. YOUNG. Representative images of cortex stained with LC3B

(40x magnification) for young (YOUNG), sedentary (SED), non-exercised (NoEXE) and exercised (EXE) animals (Fig. 2D).

Figure 3: Beclin1, LC3-II and LAMP1 levels in hippocampus (Fig. 3A, B and C) for young (YOUNG), sedentary (SED), non-exercised (NoEXE) and exercised (EXE) rats. Images show representative Western blots and bar graphs obtained from semi-quantitative image analysis, as described in the Experimental Procedures. Results are mean \pm SEM of 6 independent experiments. $^{\$}p<0.05$, $^{\$ \$ \$}p<0.001$ vs. YOUNG.

Figure 4: p62 and ubiquitinated protein levels in cortex (Fig. 4A and B) and hippocampus (Fig. 4C and D) for young (YOUNG), sedentary (SED), non-exercised (NoEXE) and exercised (EXE) rats. Images show representative Western blots and bar graphs obtained from semi-quantitative image analysis, as described in the Experimental Procedures. Results are mean \pm SEM of 6 independent experiments. $^*p<0.05$ vs. SED; $^{\#}p<0.05$ vs. NoEXE; $^{\$}p<0.05$, $^{\$ \$}p<0.01$ $^{\$ \$ \$}p<0.001$ vs. YOUNG.

Figure 5: p-mTORSer²⁴⁸¹/mTOR activation (Fig. 5A) and its phosphorylated substrate p70S6K (Fig. 5B), Beclin1 (Fig. 5C), LC3-II (Fig. 5D) and LAMP1 (Fig. 5E) levels in liver for young (YOUNG), sedentary (SED), non-exercised (NoEXE) and exercised (EXE) rats. Images show representative Western blots and bar graphs obtained from semi-quantitative image analysis, as described in the Experimental Procedures. Results are mean \pm SEM of 6 independent experiments. $^*p<0.05$, $^{***}p<0.001$ vs. SED; $^{####}p<0.001$ vs. NoEXE; $^{\$ \$}p<0.01$ $^{\$ \$ \$}p<0.001$ vs. YOUNG.

Figure 6: p-mTORSer²⁴⁸¹/mTOR activation (Fig. 6A) and its phosphorylated substrate p70S6K (Fig. 6B), and Beclin1 (Fig. 6C), LC3-II (Fig. 6D) and LAMP1 (Fig. 6E) levels in muscle for young (YOUNG), sedentary (SED), non-exercised (NoEXE) and exercised (EXE) rats. Images show representative Western blots and bar graphs obtained from semi-quantitative image analysis, as described in the Experimental Procedures. Results are mean \pm SEM of 6 independent experiments. ***p<0.001 vs. SED; ###p<0.001 vs. NoEXE; \$\$p<0.01 vs. YOUNG.

Figure 7: p62 and ubiquitinated protein levels in liver (Fig. 7A and B) and muscle (Fig. 7C and D) for young (YOUNG), sedentary (SED), non-exercised (NoEXE) and exercised (EXE) rats. Images show representative Western blots and bar graphs obtained from semi-quantitative image analysis, as described in the Experimental Procedures. Results are mean \pm SEM of 6 independent experiments. **p<0.01 vs. SED; #p<0.05 vs. NoEXE; \$p<0.05, \$\$p<0.01 vs. YOUNG.

Supplementary data

Figure S1: p-mTORSer²⁴⁸¹/mTOR activation (Fig. S1A) and its phosphorylated substrate p70S6K (Fig. S1B), and Beclin1 (Fig. S1C), LC3-II (Fig. S1D) and LAMP1 (Fig. S1E) levels in heart for young (YOUNG), sedentary (SED), non-exercised (NoEXE) and exercised (EXE) rats. Images show representative Western blots and bar graphs obtained from semi-quantitative image analysis, as described in the Experimental Procedures. Results are mean \pm SEM of 6 independent experiments. \$\$p<0.01 vs. YOUNG.

Figure S2: p62 (Fig. S2A) and ubiquitinated protein (Fig. S2B) levels in heart for young (YOUNG), sedentary (SED), non-exercised (NoEXE) and exercised (EXE) rats. Images show representative Western blots and bar graphs obtained from semi-quantitative image analysis, as described in the Experimental Procedures. Results are mean \pm SEM of 6 independent experiments.

Figure 1

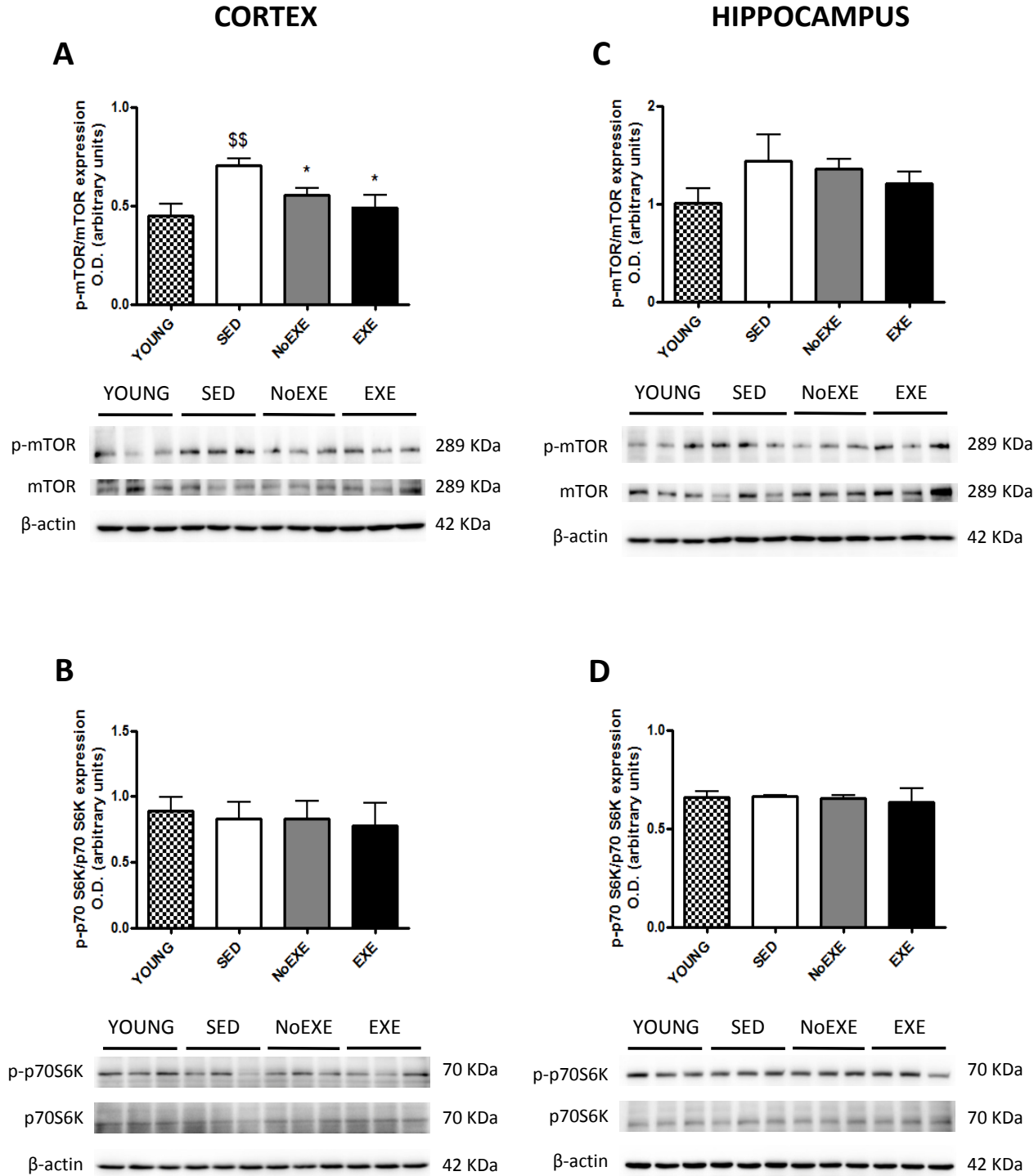


Figure 2

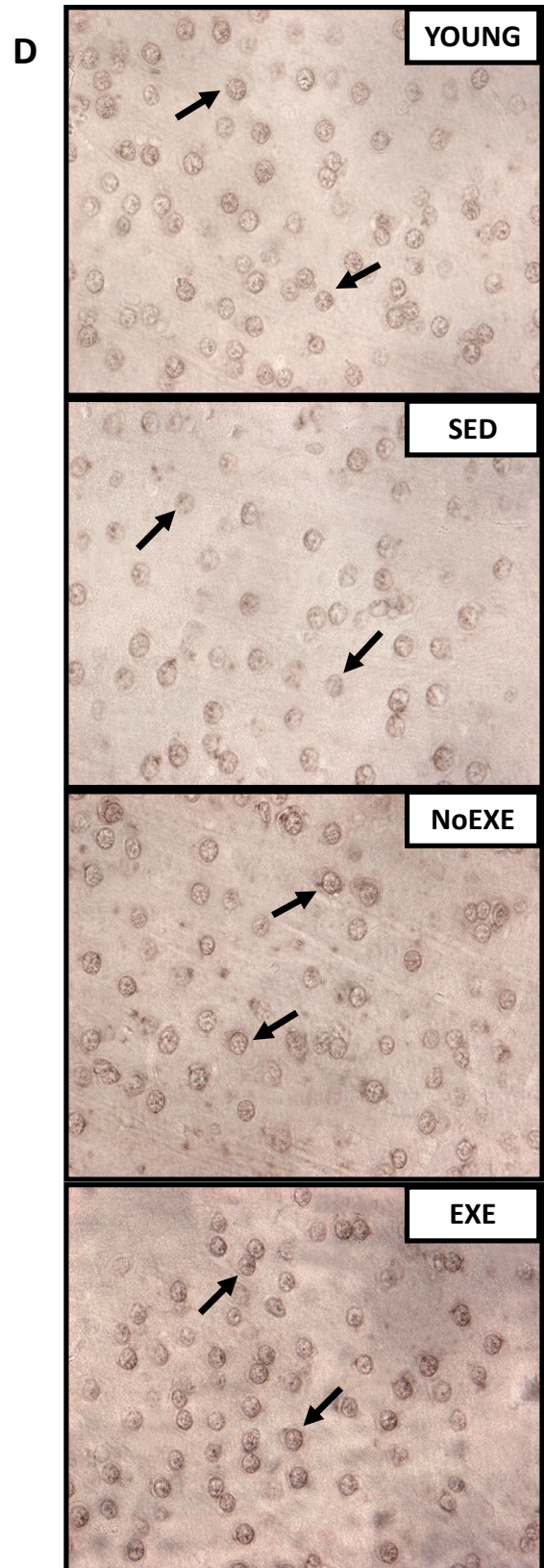
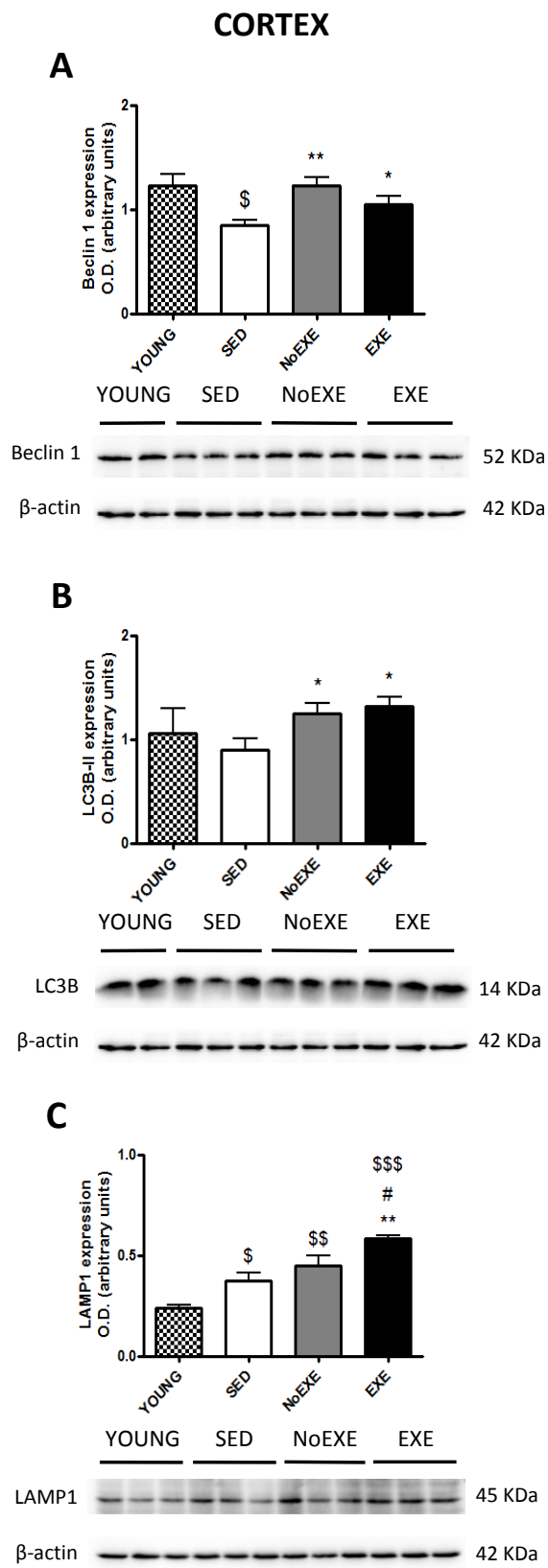


Figure 3

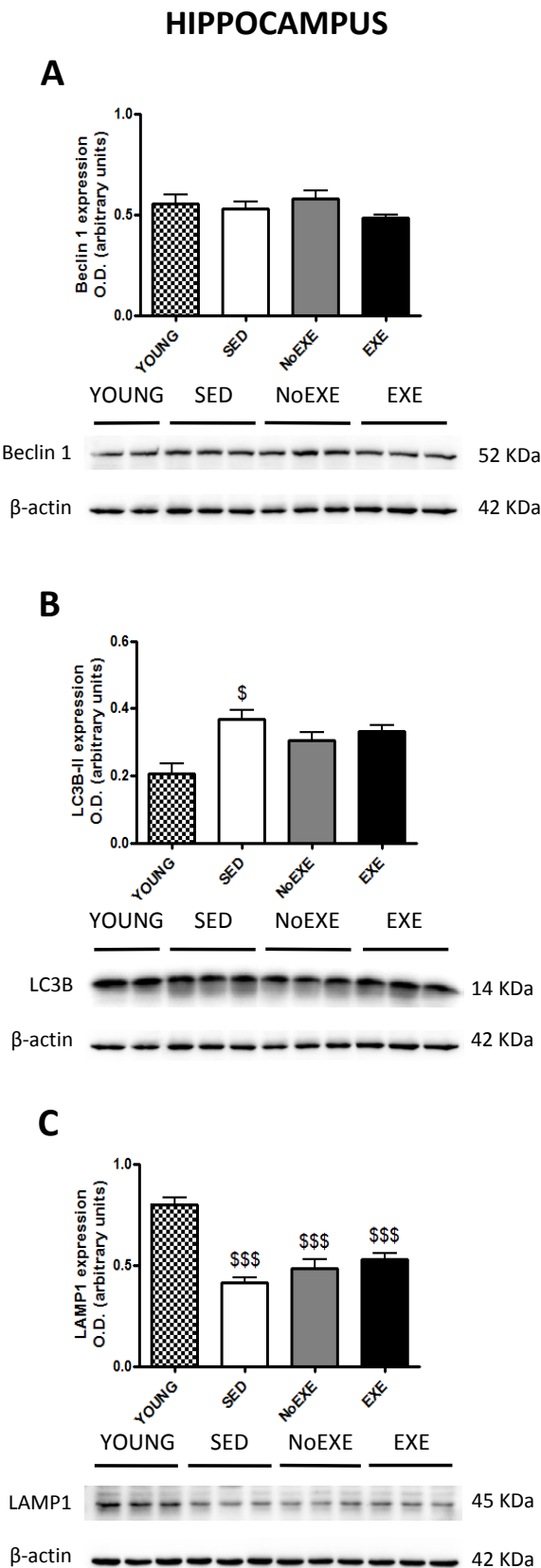


Figure 4

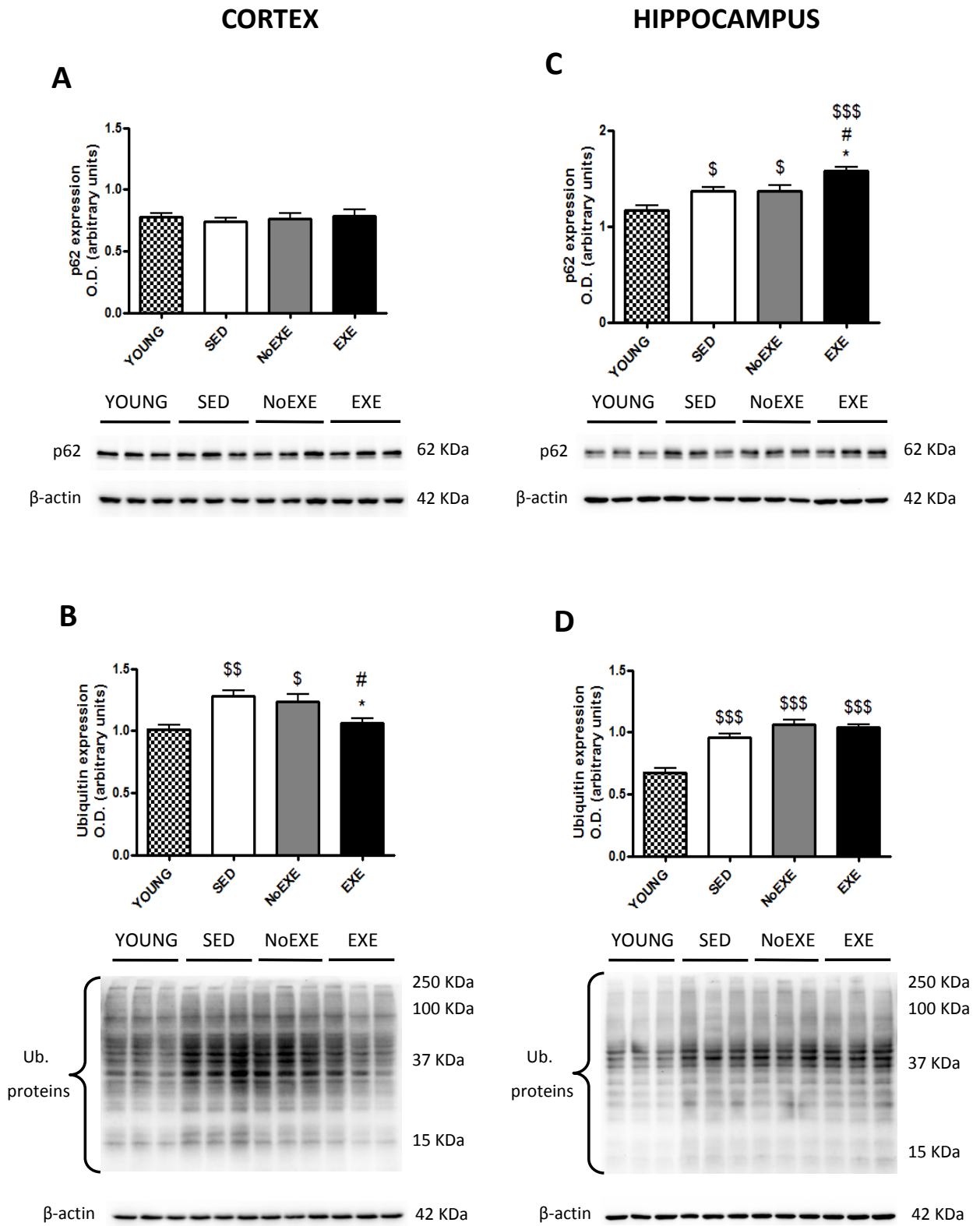


Figure 5

LIVER

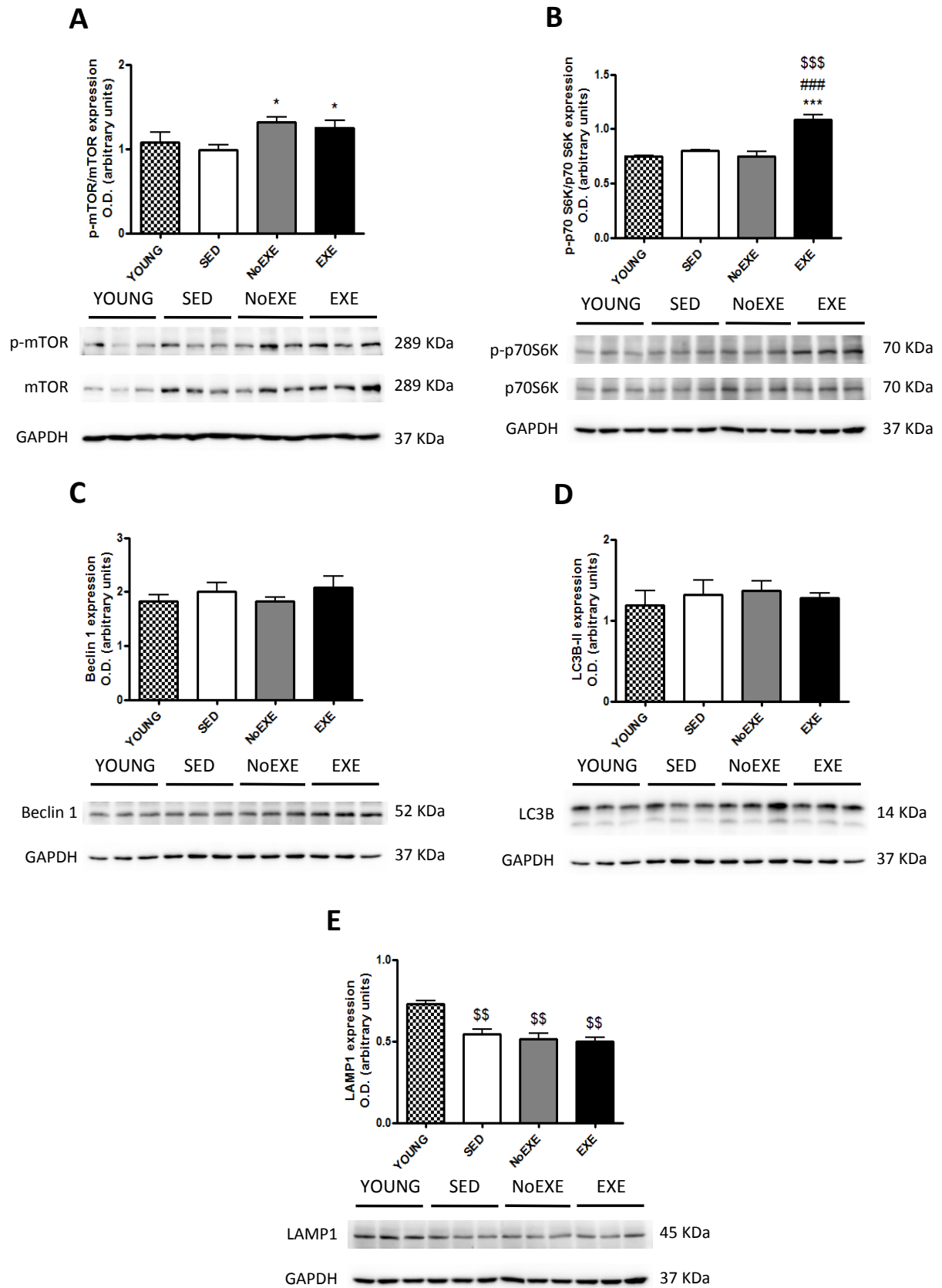


Figure 6

MUSCLE

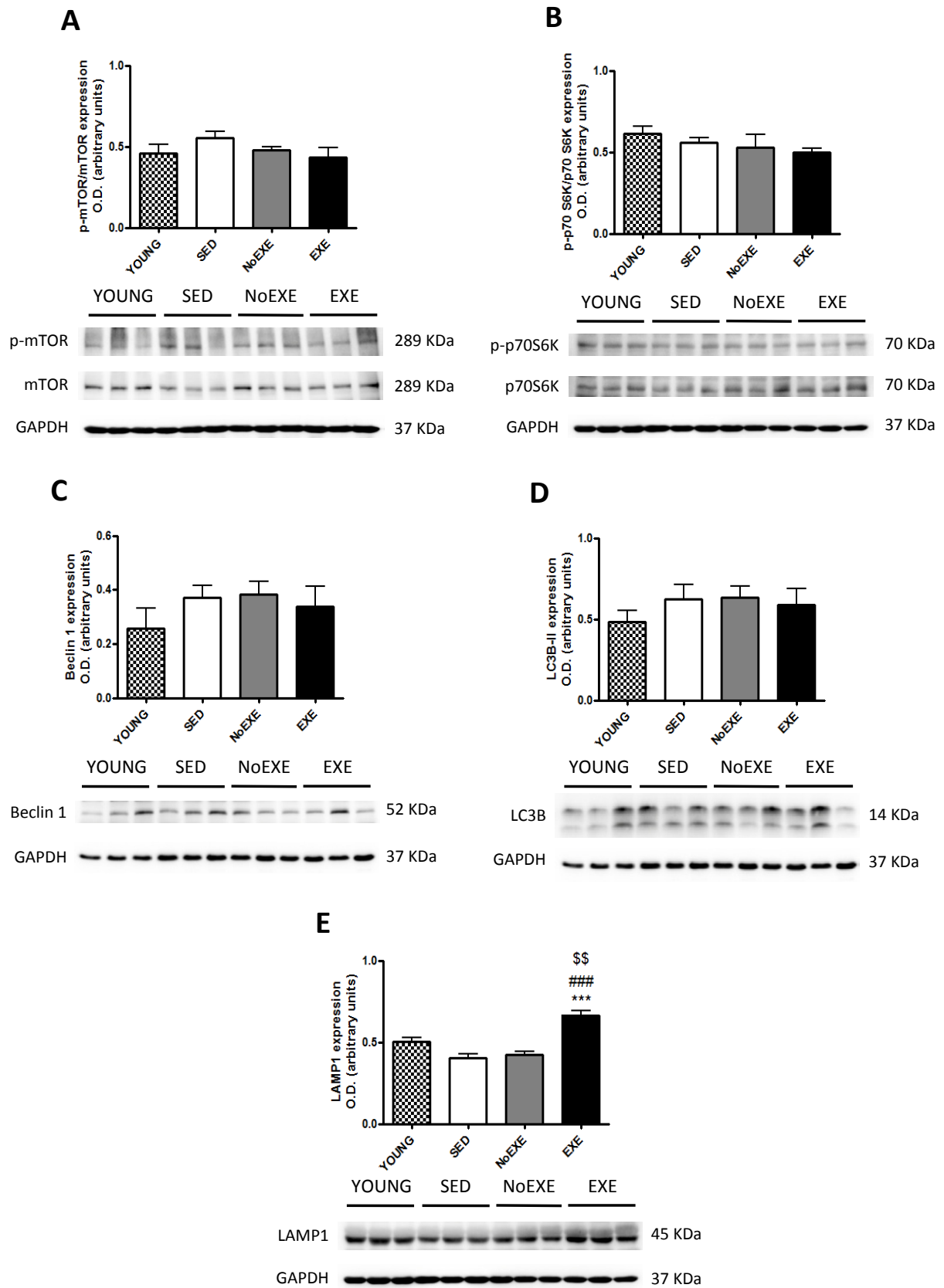
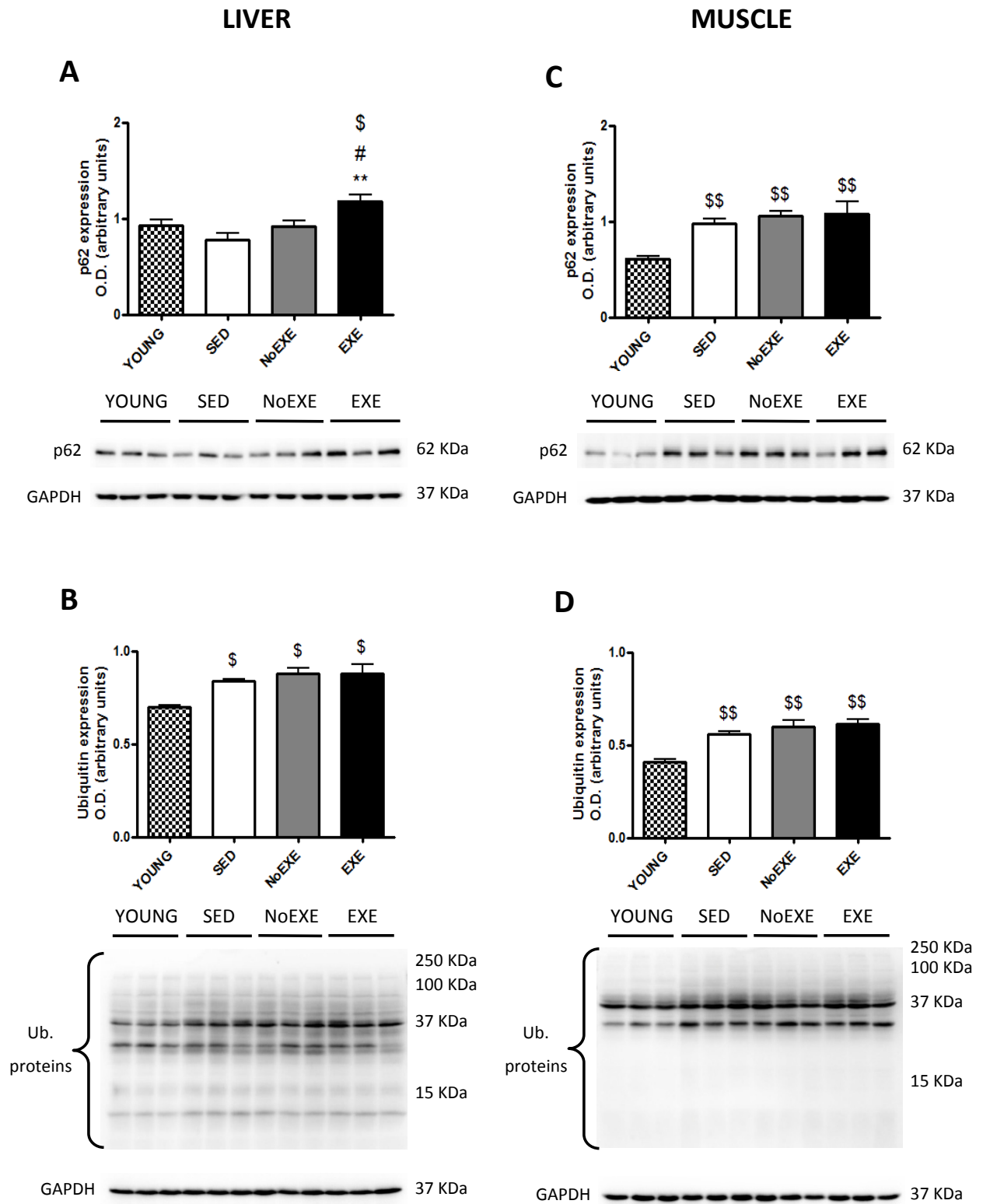
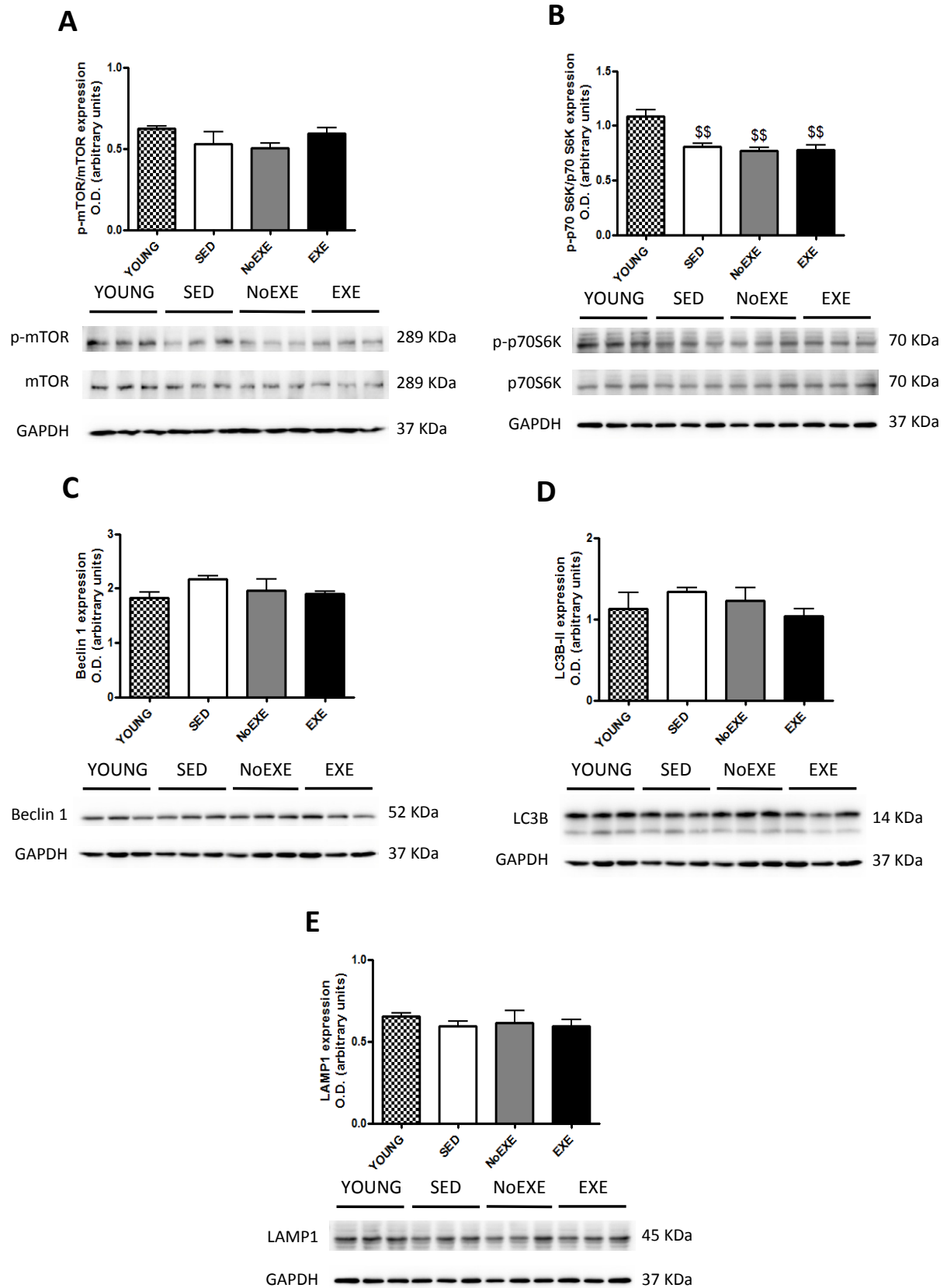


Figure 7



Supplementary data Fig. S1

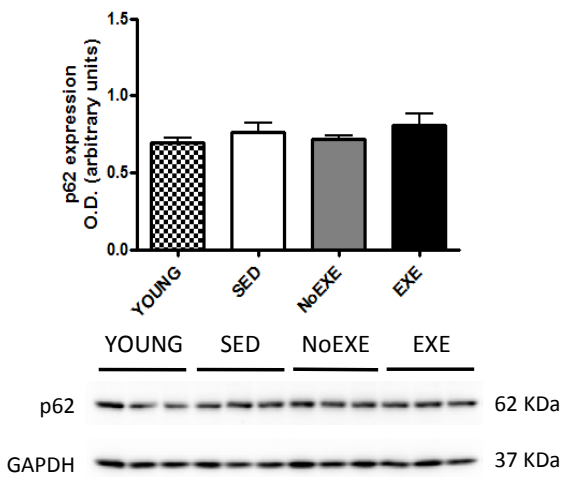
HEART



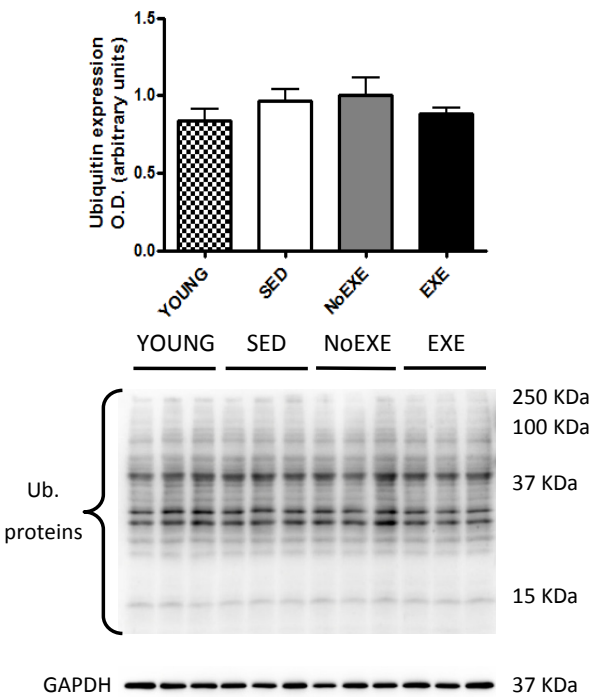
Supplementary data Fig. S2

HEART

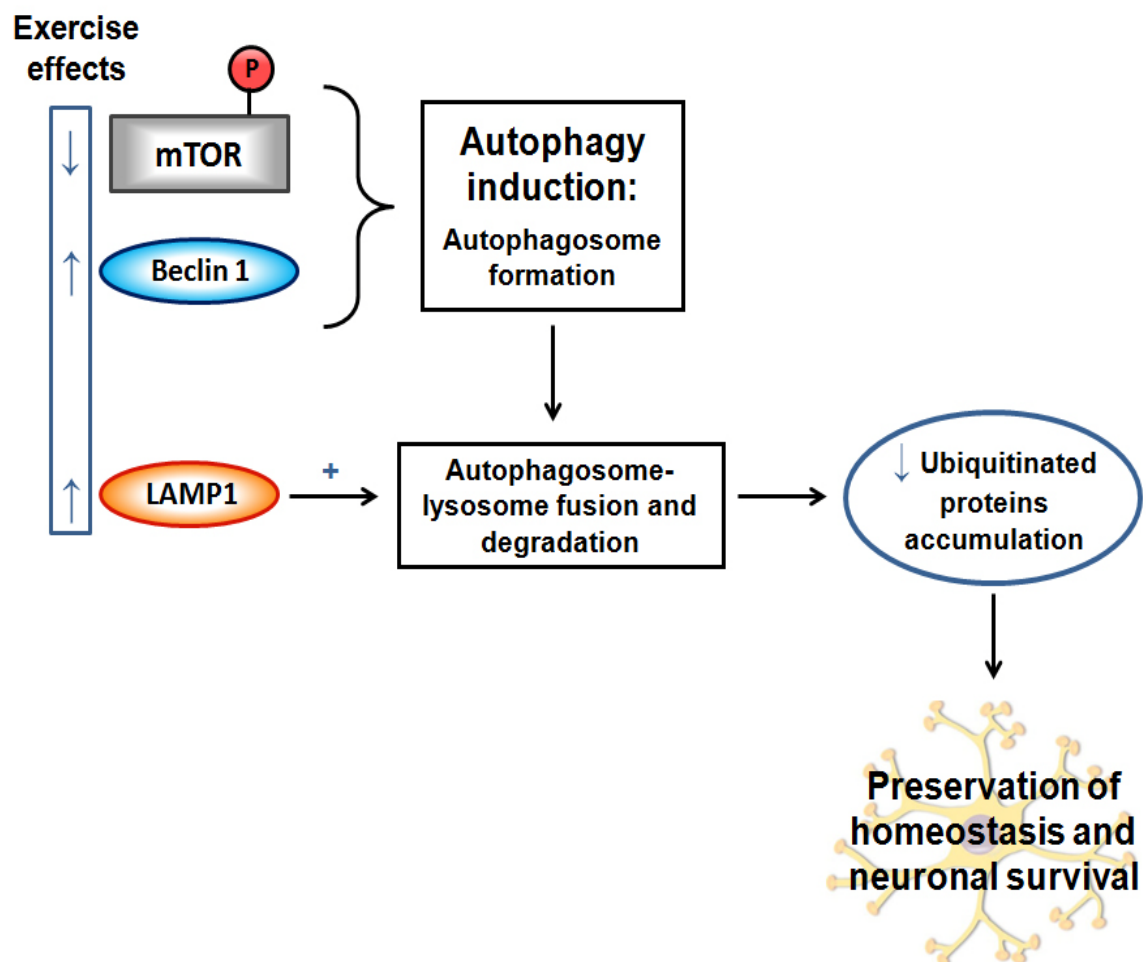
A



B



Graphical abstract



Publicació 4

**WNT PATHWAY REGULATION BY LONG-TERM
MODERATE EXERCISE IN RAT HIPPOCAMPUS**

Bayod S, Menella I, Sanchez-Roige S, Lalanza JF, Escorihuela RM,
Camins A, Pallàs M, Canudas AM

En avaluació al Experimental gerontology (2013)

L'exercici físic millora el deteriorament cognitiu associat a l'envelliment i a les malalties neurodegeneratives. La modulació tant de la neurogènesi com de la plasticitat sinàptica està implicada en els processos d'aprenentatge i memòria. Es coneix que l'exercici modula ambdós mecanismes, si bé les vies moleculars implicades no estan del tot clares. Una de les vies relacionada amb els processos de neurogènesi i plasticitat sinàptica és la via Wnt. Concretament, en la via canònica Wnt, β -catenina transloca del citoplasma al nucli, activant l'expressió de diferents gens relacionats amb l'homeòstasi i la supervivència neuronal, com *Bcl-2*, i d'altres que regulen l'activació de la via, com *Axina2*. Aquest fet té lloc quan s'activa la via. En cas contrari, β -catenina serà fosforilada pel complex de destrucció, format per Axina1, GSK-3, CK1 i APC, i posteriorment ubiquitinitzada i degradada pel proteosoma. I és l'antagonista DKK-1 qui bloquejaria la via Wnt. Així, diferents estudis apunten a DKK-1 com un dels implicats en el desenvolupament del procés neurodegeneratiu que es produeix en la malaltia d'Alzheimer i en diferents patologies dels sistema nerviós central, com la isquèmia i l'epilèpsia. A més, recentment se l'ha relacionat amb el deteriorament cognitiu associat a l'envelliment.

Es va estudiar en l'hipocamp de rates adultes els efectes de la realització d'exercici físic moderat de llarg termini i també de la manipulació dels animals sobre diferents elements que participen en la via canònica Wnt.

Els resultats d'immunohistoquímica en el gir dentat de l'hipocamp, van mostrar un menor marcatge de DKK-1 amb la manipulació i de manera més important amb l'exercici. L'anàlisi per western blot va confirmar uns nivells menors de DKK-1 en els anteriors grups experimentals. Quan es va analitzar el receptor LRP6, els nivells de fosforilació no van variar entre els diferents grups, però sí que ho van fer els seus nivells totals, determinant-se uns nivells més baixos en el grup de rates sedentàries. A més, en aquest grup, es van mesurar uns nivells més alts d'Axina1 junt amb una major activació de GSK-3 α/β . No obstant això, tant els nivells totals de β -catenina com els de la seva forma fosforilada en diferents residus, no es van modificar entre els diferents grups. D'altra banda, tant l'exercici físic com la manipulació van augmentar els nivells de la proteïna antiapoptòtica, BCL-2; en canvi, els nivells de la proteïna proapoptòtica BAX no van variar. Per últim, es van mesurar uns nivells proteics d'*Axina2* més baixos en el grup de rates sedentàries.

Així doncs, aquests resultats estableixen que l'exercici moderat de llarga durada produeix una activació de la via canònica Wnt en l'hipocamp de rates adultes. La manipulació dels animals, també desencadenaria aquesta activació.

Wnt pathway regulation by long-term moderate exercise in rat hippocampus

S. Bayod^{1,2}, I. Menella^{1,2}, S. Sanchez-Roige³, J.F. Llanza³, R.M. Escorihuela³,
A. Camins^{1,2}, M. Pallàs^{1,2} A.M. Canudas^{1,2}

¹Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia. Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona. Nucli Universitari de Pedralbes. 08028 Barcelona. Spain.

²Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED).

³Dept de Psiquiatria i Medicina Legal, Institut de Neurociències, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain.

Corresponding author:

Anna Maria Canudas, PhD.

Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia

Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, E-08028 Barcelona, Spain

e-mail: canudas@ub.edu

ABSTRACT

An active lifestyle involving regular exercise reduces the deleterious effects of the aging process. At the cerebral level, both synaptic plasticity and neurogenesis are modulated by exercise, although the molecular mechanisms underlying these effects are not clearly understood. In the mature nervous system, the canonical Wnt (Wnt/ β -catenin) signaling pathway is implicated in neuroprotection and synaptic plasticity. Here, we examined whether the Wnt pathway could be modulated in adult male rat hippocampus by long-term moderate exercise (treadmill running) or enrichment (handling/environmental stimulation). Sedentary animals showed higher protein levels of the Wnt antagonist, Dkk-1, the lowest levels being found in the exercised group. Although there was no evidence of any changes in activation of the LRP6 receptor, the total levels of LRP6 were higher in exercised and enriched animals. Analysis of some of the components implicated in the phosphorylation of β -catenin, which leads ultimately to its proteasomal degradation, revealed higher levels and activation of Axin1 and GSK-3 α/β respectively in sedentary animals. However neither different phosphorylated forms nor total β -catenin protein levels differed between the experimental groups. Higher protein levels of the antiapoptotic protein, Bcl-2, were found with exercise and handling, whereas the proapoptotic, Bax, was unaffected. Thus, our results suggest activation of the Wnt pathway not only with moderate exercise, but also with the handling of the animals.

Keywords: long-term moderate exercise, environmental enrichment, hippocampus, Wnt, Dkk-1, β -catenin

1. INTRODUCTION

Nowadays the search for ways to prolong lifespan is increasing. Different ways to improve learning and memory have been sought, among which physical activity and nutrition seem to prevent and delay the deleterious effects of the aging process (Spencer, 2008; van Praag, 2009). Physical activity has positive effects on general health and reduces the incidence of many conditions such as diabetes, osteoporosis and cardiovascular disease (Garber et al., 2011; van Praag, 2009). Moreover, studies have provided evidence indicating that exercise can also reduce the occurrence and progression of cell death in the brain, and showing the protective effect of exercise in animal models such as Parkinson's disease (PD), Alzheimer's disease (AD) and stroke (Guo et al., 2008; Tajiri et al., 2010; Um et al., 2011). The activation of molecular and cellular pathways that support and maintain brain plasticity and neurogenesis occurs and various factors play a role in these positive effects. These include the growth factors brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and insulin-like growth factor I (IGF-1), which are increased by exercise (Carro et al., 2000; Wu et al., 2010) and have been linked to learning and memory processes (Ding et al., 2006). Like exercise, an enriched environment has also been reported to have effects on synaptic plasticity, such as increased dendritic complexity, but the increase in adult neurogenesis and BDNF levels in the hippocampus is specific to exercise (Kobilo et al., 2011; Mustroph et al., 2012; Vivar et al., 2012).

Wnt signaling controls many biological pathways and has been implicated in numerous developmental and disease processes (Clevers and Nusse, 2012; Maiese et al., 2008). There is evidence to suggest that the loss of function of the Wnt pathway is

involved in the neurodegeneration present in various central nervous system disorders, including Alzheimer's disease and ischemia (Inestrosa and Toledo, 2008; Caraci et al., 2008). The key regulatory step in the canonical Wnt (Wnt/ β -catenin) signaling pathway involves the phosphorylation of its downstream effector protein, β -catenin, by the cytoplasmic destruction complex, which takes place in the absence of the Wnt ligands. This complex consists of the central scaffold protein Axin1, the adenomatous polyposis coli (APC), the glycogen synthase kinase-3 α/β (GSK-3 α/β) and the casein kinase-1 (CKI) (Clevers and Nusse, 2012; Li et al., 2012). Phosphorylated β -catenin is then recognized by the F-box-containing protein β -TrCP, part of an E3 ubiquitin ligase complex. As a consequence, β -catenin is ubiquitinated and finally degraded by the proteasome. On the other hand, when Wnt ligands bind to the frizzled receptor and the low-density-lipoprotein-related protein 5/6 (LRP5/6) coreceptor, the Wnt pathway is activated, leading to stabilization and nuclear translocation of β -catenin. In the nucleus, β -catenin engages TCF/LEF transcription factors to activate Wnt-responsive target genes, which in the mature nervous system play a key role in neuroprotection and synaptic plasticity (Inestrosa et al., 2012).

Dkk-1 is an inhibitor of the Wnt pathway, and antagonizes signaling by binding LRP5/6 (Caraci et al., 2008). During recent years there has been growing interest in this Wnt antagonist, as Dkk-1 induction has been found to precede neuronal death in models of AD (Rosi et al., 2010) and PD (Dun et al., 2012). Recently, Purro and coworkers (2012) demonstrated in mature rat hippocampal neurons that Dkk-1 decreases the number of synapses, an early event in AD that might contribute to cognitive decline. This fact, together with the higher expression of Dkk-1 found in brains of AD patients (Caricasole

et al., 2004), suggests that Dkk-1 may be a potential therapeutic target for the treatment of AD.

In this context we focused our study on the possible involvement of Wnt signaling in the beneficial effects of exercise. For this reason our main goal was to evaluate the regulation of different Wnt pathway components in adult rat hippocampus by long-term moderate exercise.

2. EXPERIMENTAL PROCEDURES

2.1 Animals and general procedure

The exercise protocol was described in earlier reports (Bayod et al., 2011; Lanza et al., 2012). Twenty-nine male Sprague-Dawley rats aged 5 weeks at the beginning of the experiment were semi-randomly distributed into three experimental groups: exercised (EXE; n=12), treadmill control (NoEXE; n=9) and sedentary (SED; n=8). At the end of the experiment rats were 10 months old. After isoflurane anesthesia, the animals were killed by decapitation between 9:00 h and 12:00 h. The brain was immediately removed and dissected into cortex and hippocampus. Brain tissues were frozen in powdered dry ice and maintained at -80°C until use. In addition, four brains from each group were processed for immunohistochemical analysis. Briefly, the tissue was fixed in methacarn and processed for paraffin-embedded immunohistochemistry. The experimental protocol was approved by the *Ethics Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona* and complied with 'Principles of laboratory animal care' and the European Communities Council Directive (86/609/EEC).

2.2 Exercise regime

A treadmill consisting of three parallel runways (45 cm long, 11 cm wide and 12 cm deep) was used. The apparatus was placed at an inclination of 0° in the cage. On the first day, the rats were placed in the treadmill for 30 min without running in order to become habituated to the apparatus and to diminish subsequent exercise-induced stress. Exercise sessions were conducted between 13:30 h and 16:30 h, 4–5 days per week for 36 weeks. Neither electrical shock nor physical prodding was used to force training. For the EXE group, the treadmill started at a speed of 4.2 m/min, and increased progressively by 1 m/min every 30 sec to a speed of 12 m/min (which was reached between minute 3 to 12). NoEXE rats were placed individually on another treadmill (0 m/s) for the same number of sessions and the same duration as the EXE group. Thus, treadmill control and exercised rats were handled in the same manner and spent the same amount of time out of the home cage. The SED group was handled once a week for cage cleaning and tail marking.

2.3 Western-blot analysis

Aliquots of homogenized protein containing 20 µg per sample were analyzed by Western blot. The protein samples were separated by SDS–PAGE (10–15%) and transferred to PVDF membranes (Millipore). The membranes were blocked in 5% non-fat milk in TBS containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) for 1 h at room temperature, followed by an overnight incubation at 4°C with antibodies against Dkk-1 (1:500; Santa Cruz), p-LRP6 Ser¹⁴⁹⁰ and LRP6 (1:500; Cell Signaling), Axin1 (1:500; Cell Signaling), GSK3α (1:1000; Cell Signaling), GSK3β (1:1000; Cell Signaling), p-GSK3α/β Tyr^{279/216} (1:500; Upstate), p-βcatenin Ser⁵⁵², p-βcatenin Ser⁶⁷⁵, p-βcatenin Ser^{33,37}Thr⁴¹, βcatenin

(1:500; Cell Signaling), Axin2 (1:500; Cell Signaling), Bax (1:1000; Cell Signaling), Bcl-2 (1:1000; Cell Signaling) and β -actin (1:20000; Sigma). Membranes were then washed and incubated with secondary antibodies for 1 h at room temperature. Immunoreactive protein was viewed with a chemiluminescence-based detection kit, following the manufacturer's protocol (ECL kit; Millipore) and digital images were acquired using a ChemiDoc XRS+ System (BioRad). Semiquantitative analyses were carried out using Image Lab software (BioRad) and the results were expressed in arbitrary units. Protein loading was routinely monitored by phenol red staining of the membrane or by immunodetection of β -actin.

2.4 Immunohistochemical analysis

Tissue samples were deparaffinized in xylene and rehydrated through a descending ethanol gradient diluted in Milli-Q water (100%, 95% and 80%), 3 min in each solution. Afterwards, the brain sections were rinsed in PBS before quenching of endogenous peroxidase activity with PBS containing 0.3% H₂O₂ and 10% methanol, for 15 min at room temperature in the dark. After washing in PBS for 3 x 5 min and in PBS containing 0.5% Triton X-100 for 3 x 5 min, the tissues were blocked with 0.2% (w/v) gelatin in PBS containing 3% fetal bovine serum (FBS), 0.5% Triton, 0.2% bovine serum albumin (BSA) and 0.2% sodium azide for 1 h at room temperature in a humidified chamber. They were then washed for 3 x 5 min in PBS-Triton and incubated with the primary antibody (see below) diluted in the same buffer used in the blocking step, overnight at 4°C. After washing in PBS-Triton for 3 x 5 min, the brain sections were incubated with biotinylated secondary antibody (see below) diluted in 0.2% (w/v) gelatin in PBS containing 1% FBS, 0.1% Triton and 0.2% BSA for 2 h at room temperature in a

humidified chamber. Tissues were washed in PBS-Triton for 3 x 5 min and incubated with ABC reagent (see below) for 90 min at room temperature in a humidified chamber. After washing in PBS-Triton for 2 x 5 min and PB for 2 x 5 min, the brain sections were incubated in peroxidase substrate solution (PB containing 0.05% 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) and 0.005% H₂O₂) until optimal color developed at room temperature. Finally, slides were washed for 3 x 5 min in PB, dehydrated through an ascending ethanol gradient (70%, 90% and 100%) and xylene, 3 min in each solution, and mounted in DPX, then allowed to dry overnight at room temperature. Images were taken with a microscope (BX41, Olympus, Germany) at 20x magnification.

We used rabbit polyclonal anti-Dkk-1 (1:50; Santa Cruz) as the primary antibody, goat anti-rabbit IgG–Biotin (1:200; Sigma) as the secondary antibody and VECTASTAIN® Elite ABC reagent (1:100; Vector Laboratories).

2.5 Data analysis

The results are expressed as the mean \pm SEM from at least five to six samples. In all cases, data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc Tukey–Kramer multiple-comparison tests. P values lower than 0.05 were considered significant.

3. RESULTS

Regulation of Dickkopf-1 expression in hippocampus by exercise

To investigate the expression of the Wnt pathway antagonist in the hippocampus after 36 weeks of treadmill, Dkk-1 was evaluated by immunohistochemistry and Western blotting. Immunohistochemical analysis revealed a stronger signal in the dentate gyrus

of the SED animals in comparison with the NoEXE and EXE groups, the weakest signal being in EXE animals (Fig. 1A). Dkk-1 blots also showed similar results regarding expression, with a statistically significant increase in sedentary animals (Fig. 1B).

Changes in Wnt signaling pathway components after long-term exercise

First of all, we studied the activation of the LRP6 receptor. Upon Wnt stimulation, LRP6 is phosphorylated at multiple sites by kinases such as GSK-3 and CK1 (Zeng et al., 2005). Phosphorylated LRP6 recruits Axin1 to the membrane and presumably activates β -catenin signaling. We did not observe any modification in the phosphorylated LRP6 (p-LRP6) after handling or in exercised animals, although a slight but not significant decrease in levels was observed in sedentary animals. However, when we considered the total protein levels of LRP6, significantly higher levels were found in NoEXE and EXE animals (Fig. 2A).

Axin1 is a scaffold protein that promotes the GSK-3 β -mediated phosphorylation and subsequent degradation of β -catenin (Li et al., 2012). Evaluation of Axin1 protein levels by Western blot showed higher levels in SED animals than in the NoEXE or EXE groups (Fig. 2B).

GSK-3 α/β phosphorylation in Tyr279/216 was studied in order to evaluate its activation in our model (Joje et al., 2007). Western blot analysis showed the same pattern of activation of the two homologs of GSK-3, with an increase in protein levels of the active form of GSK-3 in SED rats compared with the NoEXE and EXE groups (Fig.

3).

Total and different phosphorylated forms of β -catenin were also studied. Phosphorylation of β -catenin at Ser552 by Akt or PKA, or at Ser675 by PKA, induces β -catenin accumulation in the nucleus and increases its transcriptional activity (Fang et al., 2007; Taurin et al., 2006). On the other hand, β -catenin is destabilized when GSK3 phosphorylates it at Ser33, Ser37 and Thr41 (Liu et al., 2002). No changes were found either in the different forms of phosphorylated β -catenin or in the total β -catenin protein levels (Fig. 4A–D)

On the other hand, we analyzed Axin2, which is a direct target of the Wnt pathway. Furthermore, Axin2 constitutes a negative feedback loop that controls Wnt signaling activity (Lustig et al., 2002). We found a slight but not statistically significant decrease in Axin2 protein levels in the SED group (Fig. 5A).

Modulation of Bax and Bcl-2 by exercise

Regulation of Bax and Bcl-2 by the Wnt pathway has been described. Thus, when the Wnt pathway is blocked, an increase in Bax protein levels is associated with a reduction in Bcl-2 (Scali et al., 2006). On the other hand, Wnt pathway activation induces increased Bcl-2 mRNA levels (Fuentelba et al., 2004). Our Western blot results showed no differences in the Bax protein levels between the different experimental groups (Fig. 5B). Nevertheless, lower protein levels of Bcl-2 were found in SED animals (Fig. 5C).

4. DISCUSSION

Physical inactivity and a sedentary lifestyle are recognized risk factors for several chronic diseases, whereas an increase in exercise and physical activity is associated with a lower risk of developing coronary heart disease, stroke, type 2 diabetes, and some forms of cancer (e.g., colon and breast cancers) (Garber et al., 2011). Moreover, a physically active lifestyle in adults and the elderly results in improvements in the cognitive impairment associated with aging (Nemati Karimooy et al., 2012; Smith et al., 2010), reduces the risk of dementia (Ahlskog et al., 2011; Geda et al., 2010) and may be helpful for people with dementia and other neurodegenerative disease (Kemoun et al., 2010; Venturelli et al., 2011). Furthermore, physical activity over the life course makes the brain more resistant to cognitive impairment in late life, a term known as “cognitive reserve” (Middleton et al., 2010; Nithianantharajah and Hannan, 2009).

During recent years, there has been growing interest in the understanding of biological mechanisms responsible for the beneficial effects of exercise. Neurogenesis and synaptic plasticity in the hippocampus have important roles in learning and memory processes, and various related aspects are modified by exercise (Clark et al., 2009; Mustroph et al., 2012; Stranahan et al., 2007; van Praag, 2009; Wu et al., 2008). Some data provide evidence that Wnt ligands play a role in adult hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity (Gogolla et al., 2009; Lie et al., 2005). Although Stranahan and coworkers (2010) reported modifications in Wnt gene expression in the hippocampus after voluntary exercise, the roles of Wnt signaling in exercise-induced hippocampal plasticity and learning and memory remain to be established. For this reason, in the current study we focused on canonical Wnt signaling as a molecular pathway that

could be modulated in the hippocampus after long-term moderate exercise (EXE) and/or environmental enrichment (NoEXE). In the latter condition, the animals were handled and exposed to stationary treadmills for the same duration as the exercised group. We included the latter experimental group because other authors found similar effects in middle-aged rats after 8 months of treadmill training and also with handling, reporting an improvement in age-related impairment of spatial learning and associated cellular mechanisms (plasticity and growth factor expression) (O'Callaghan et al., 2009). Given the extensive handling that the manipulated group received and their regular exposure to an environment outside the home cage, these authors suggested that this group could be considered to have experienced environmentally enriched conditions when compared with the non-handled (or sedentary, SED) group.

When the Wnt pathway is activated, β -catenin translocates to the nucleus where it activates the expression of genes that are involved in the regulation of homeostasis and neuronal survival (Caraci et al., 2008). On the other hand, in the absence of Wnt, the destruction complex binds and phosphorylates β -catenin, which targets it for ubiquitination and subsequent proteasome-mediated degradation. In this respect, it has been reported that downregulation of Wnt/ β -catenin signaling causes degeneration of hippocampal neurons in vivo (Kim et al., 2011).

One of the most extensively studied Wnt antagonists is Dkk-1. Interest in this Wnt antagonist has grown in recent years as it has been identified as a component of the sequence of events that take place in neuronal death in different neurodegenerative diseases. In fact, increased expression of Dkk-1 has been found in vitro and in vivo in different models of AD and frontotemporal dementia (Rosi et al., 2010), as well as in the degenerating neurons of AD patients (Caricasole et al., 2004), cultured neurons

treated with β -amyloid, and neurons exposed to excitotoxic or ischemic insults (Cappuccio et al., 2005; Caricasole et al., 2004). Moreover, Seib and coworkers (2013) have recently demonstrated that reducing Dkk-1 expression can counteract age-related decrease in neurogenesis and its associated cognitive decline. In our rat model, immunohistochemical analysis with Dkk-1 revealed a stronger signal in the dentate gyrus of the SED rats than in the NoEXE and EXE groups, the EXE rats presenting less immunoreactivity for Dkk-1. In addition, the Western blot results showed increased Dkk-1 protein levels in sedentary animals with respect to exercised or handled animals. Cross-talk between Wnt signaling and the sirtuin 1 longevity pathway has been described (Pasco et al., 2010; Holloway et al., 2010). Moreover, in vitro studies have shown that sirtuin 1 reduces Dkk-1 expression (Hussain et al., 2009). On the other hand, Dkk-1 can be induced by p53 (Caricasole et al., 2004; Wang et al., 2000), which is one of the most important substrates of sirtuin 1 (Pallàs et al., 2008). It is known that p53 acetylation increases its activity and stability (Ito et al., 2001). In reference to this fact, we have previously determined a correlation between increased levels of sirtuin 1 and a reduction in the acetylated form of p53, in the hippocampus of EXE and NoEXE animals (Bayod et al., 2011). These results are consistent with our present findings that the Dkk-1 induction observed in sedentary animals correlates with the lower levels of sirtuin 1 and increased levels of the acetylated form of p53 measured in these animals. Our analysis of different components of the Wnt pathway initially focused on the activation of the LRP6 receptor. Although no significant differences were observed in the phosphorylated state of the LRP6 receptor between groups, the total protein levels of LRP6 were higher in NoEXE and EXE animals. Next, we studied some of the components of the destruction complex, such as Axin1 and GSK-3 α/β activation. In

accordance with the Dkk-1 results, higher levels of Axin1 and increased activation of GSK-3 α/β according to its phosphorylation on Tyr279/216, were measured in SED animals. Therefore, it appears that in SED animals Axin1 may facilitate the GSK-3-mediated phosphorylation of β -catenin, thereby targeting it for ubiquitylation and proteasomal degradation. On the other hand, decreased Axin1 levels and a reduction in GSK-3 activation in EXE and NoEXE animals suggest an increase in nuclear translocation and Wnt pathway activation, promoting neuronal survival in these animals. However, neither the different phosphorylated forms of β -catenin nor the total β -catenin protein levels differed between groups. In reference to this fact, it is important to note that small changes in β -catenin protein levels can correspond to dramatic tissue phenotypes known to rely on β -catenin signaling (Cox et al., 1996, 1999).

As previously mentioned, Dkk-1 has been implicated in the neuronal death process that occurs during neurodegenerative disease or is induced by various insults (Busceti et al., 2007; Rosi et al., 2010). Loss of neuronal viability caused by Dkk-1 could be related to the induction of the proapoptotic protein Bax, together with downregulation of the antiapoptotic protein Bcl-2 (Scali et al., 2006). Protein levels of Bax were not modified by exercise or by handling, unlike those of Bcl-2. In SED animals, Bcl-2 expression was lower than in EXE and NoEXE animals. These results show that exercise and enrichment can increase the expression of this antiapoptotic protein and probably explain in part the positive effects of both strategies at the cerebral level. Moreover, the fact that higher Axin2 protein levels were found in the EXE and NoEXE groups could also be related to an activation of the Wnt pathway in these animals.

Here we identified a participant in the cascade of events that take place in the hippocampus of adult rats after long-term moderate exercise and enrichment. Under such conditions, activation of the Wnt pathway is present. This is likely to be an important step due to its cross-talk with other factors that are known to mediate the beneficial effects of exercise. No significant differences were found between those animals that had been handled without doing exercise and those that had exercised according to the protocol described above. Some authors described differences between exercise and environmental enrichment in the regulation of BDNF and neurogenesis (Kobilo et al., 2011; Mustroph et al., 2012), but it seems that synaptic plasticity could be modified by both strategies (Beauquis et al., 2010; Stranahan et al., 2007). In this respect, it has been reported that Wnt signaling regulates synapse numbers and hippocampal network structure in adult mice (Gogolla et al., 2009). Previously, we reported an increase in the presynaptic vesicle protein, synaptophysin (Vaynman et al., 2006), in the hippocampus of exercised rats (Bayod et al., 2011) but not in handled rats. Contrary to other studies (O'Callaghan et al., 2009), our results indicate that handling is not sufficient to modulate synaptic plasticity in the hippocampus. Thus, environmental enrichment with several objects present in the animals' quarters, such as toys, small plastic houses, tubes, etc., could be more suitable to modulate synaptophysin levels and other parameters linked to brain plasticity (Beauquis et al., 2010; Lambert et al., 2005). Thus, although long-term treadmill exercise and handling are both important strategies for modulating the Wnt pathway, only exercise was able to increase synaptic plasticity in the hippocampus of adult rats.

Based on all our results, we suggest that the induction of Dkk-1 could be responsible in part for the different pathological processes at the cerebral level caused by a sedentary lifestyle, due to inhibition of the Wnt neuronal survival functions.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Language Advisory Service of the University of Barcelona for revising the manuscript. This study was supported by grants SAF-2009-13093 and SAF-2011-23631 from the “Ministerio de Educación y Ciencia”, DPS2008-06998-C01,C02 from the “Instituto de Salud Carlos III”, 2009/SGR00893 from the “Generalitat de Catalunya” and 610RT0405 from the Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). S.B. was supported by a predoctoral fellowship (APIF) from the University of Barcelona.

6. REFERENCE LIST

Ahlskog, J.E., Geda, Y.E., Graff-Radford, N.R., Petersen, R.C., 2011. Physical exercise as a preventive or disease-modifying treatment of dementia and brain aging. *Mayo Clin. Proc.* 86, 876-884.

Bayod, S., Del Valle, J., Canudas, A.M., Lalanza, J.F., Sanchez-Roige, S., Camins, A., Escorihuela, R.M., Pallàs, M., 2011. Long-term treadmill exercise induces neuroprotective molecular changes in rat brain. *J. Appl. Physiol.* 111, 1380-1390.

Beauquis, J., Roig, P., De Nicola, A.F., Saravia, F., 2010. Short-term environmental enrichment enhances adult neurogenesis, vascular network and dendritic complexity in the hippocampus of type 1 diabetic mice. *PLoS One* 5, e13993.

Busceti, C.L., Biagioni, F., Aronica, E., Rizzo, B., Storto, M., Battaglia, G., Giorgi, F.S., Gradini, R., Fornai, F., Caricasole, A., Nicoletti, F., Bruno, V., 2007. Induction of the Wnt inhibitor, Dickkopf-1, is associated with neurodegeneration related to temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 48, 694-705.

Cappuccio, I., Calderone, A., Busceti, C.L., Biagioni, F., Pontarelli, F., Bruno, V., Storto, M., Terstappen, G.T., Gaviraghi, G., Fornai, F., Battaglia, G., Melchiorri, D., Zukin, R.S., Nicoletti, F., Caricasole, A., 2005. Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is required for the development of ischemic neuronal death. *J. Neurosci.* 25, 2647-2657.

Caraci, F., Busceti, C., Biagioni, F., Aronica, E., Mastroiacovo, F., Cappuccio, I., Battaglia, G., Bruno, V., Caricasole, A., Copani, A., Nicoletti, F., 2008. The Wnt antagonist, Dickkopf-1, as a target for the treatment of neurodegenerative disorders. *Neurochem. Res.* 33, 2401-2406.

Caricasole, A., Copani, A., Caraci, F., Aronica, E., Rozemuller, A.J., Caruso, A., Storto, M., Gaviraghi, G., Terstappen, G.C., Nicoletti, F., 2004. Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's brain. *J. Neurosci.* 24, 6021-6027.

Carro, E., Nuñez, A., Busiguina, S., Torres-Aleman, I., 2000. Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J. Neurosci.* 20, 2926-2933.

Clark, P.J., Brzezinska, W.J., Puchalski, E.K., Krone, D.A., Rhodes, J.S., 2009. Functional analysis of neurovascular adaptations to exercise in the dentate gyrus of young adult mice associated with cognitive gain. *Hippocampus* 19, 937-950.

Clevers, H., Nusse, R., 2012. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* 149, 1192-1205.

Cox, R.T., Kirkpatrick, C., Peifer, M., 1996. Armadillo is required for adherens junction assembly, cell polarity, and morphogenesis during *Drosophila* embryogenesis. *J. Cell Biol.* 134, 133-148.

Cox, R.T., Pai, L.M., Kirkpatrick, C., Stein, J., Peifer, M., 1999. Roles of the C terminus of Armadillo in Wingless signaling in *Drosophila*. *Genetics* 153, 319-332.

Ding, Q., Vaynman, S., Akhavan, M., Ying, Z., Gomez-Pinilla, F., 2006. Insulin-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise-induced cognitive function. *Neuroscience* 140, 823-833.

Dun, Y., Li, G., Yang, Y., Xiong, Z., Feng, M., Wang, M., Zhang, Y., Xiang, J., Ma, R., 2012. Inhibition of the canonical Wnt pathway by Dickkopf-1 contributes to the neurodegeneration in 6-OHDA-lesioned rats. *Neurosci. Lett.* 525, 83-88.

Fang, D., Hawke, D., Zheng, Y., Xia, Y., Meisenhelder, J., Nika, H., Mills, G.B., Kobayashi, R., Hunter, T., Lu, Z., 2007. Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 282, 11221-11229.

Fuentealba, R.A., Farias, G., Scheu, J., Bronfman, M., Marzolo, M.P., Inestrosa, N.C., 2004. Signal transduction during amyloid-beta-peptide neurotoxicity: role in Alzheimer disease. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 47, 275-289.

Garber, C.E., Blissmer, B., Deschenes, M.R., Franklin, B.A., Lamonte, M.J., Lee, I.M., Nieman, D.C., Swain, D.P., American College of Sports Medicine. American College of Sports Medicine position stand., 2011. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 43, 1334-1359.

Geda, Y.E., Roberts, R.O., Knopman, D.S., Christianson, T.J., Pankratz, V.S., Ivnik, R.J., Boeve, B.F., Tangalos, E.G., Petersen, R.C., Rocca, W.A., 2010. Physical exercise, aging, and mild cognitive impairment: a population-based study. *Arch. Neurol.* 67, 80-86.

Gogolla, N., Galimberti, I., Deguchi, Y., Caroni, P., 2009. Wnt signaling mediates experience-related regulation of synapse numbers and mossy fiber connectivities in the adult hippocampus. *Neuron* 62, 510-525.

Guo, M., Lin, V., Davis, W., Huang, T., Carranza, A., Sprague, S., Reyes, R., Jimenez, D., Ding, Y., 2008. Preischemic induction of TNF-alpha by physical exercise reduces blood-brain barrier dysfunction in stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 1422-1430.

Holloway, K.R., Calhoun, T.N., Saxena, M., Metoyer, C.F., Kandler, E.F., Rivera, C.A., Pruitt, K., 2010. SIRT1 regulates Dishevelled proteins and promotes transient and constitutive Wnt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 107, 9216-9221.

Hussain, M., Rao, M., Humphries, A.E., Hong, J.A., Liu, F., Yang, M., Caragacianu, D., Schrump, D.S., 2009. Tobacco smoke induces polycomb-mediated repression of Dickkopf-1 in lung cancer cells. *Cancer Res.* 69, 3570-3578.

Inestrosa, N.C., Montecinos-Oliva, C., Fuenzalida, M., 2012. Wnt signaling: role in Alzheimer disease and schizophrenia. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 7, 788-807.

Inestrosa, N.C., Toledo, E.M., 2008. The role of Wnt signaling in neuronal dysfunction in Alzheimer's Disease. *Mol. Neurodegener.* 3, 9.

Ito, A., Lai, C.H., Zhao, X., Saito, S., Hamilton, M.H., Appella, E., Yao, T.P., 2001. p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *EMBO J.* 20, 1331-1340.

Joep, R.S., Yuskaitis, C.J., Beurel, E., 2007. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem. Res.* 32, 577-595.

Kemoun, G., Thibaud, M., Roumagne, N., Carette, P., Albinet, C., Toussaint, L., Paccalin, M., Dugué, B., 2010. Effects of a physical training programme on cognitive function and walking efficiency in elderly persons with dementia. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 29, 109-114.

Kim, H., Won, S., Hwang, D.Y., Lee, J.S., Kim, M., Kim, R., Kim, W., Cha, B., Kim, T., Kim, D., Costantini, F., Jho, E.H., 2011. Downregulation of Wnt/ β -catenin signaling causes degeneration of hippocampal neurons in vivo. *Neurobiol. Aging.* 32, 2316.e1-15.

Kobilo, T., Liu, Q.R., Gandhi, K., Mughal, M., Shaham, Y., van Praag, H., 2011. Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. *Learn. Mem.* 18, 605-609.

Lalanza, J.F., Sanchez-Roige, S., Gagliano, H., Fuentes, S., Bayod, S., Camins, A., Pallàs, M., Armario, A., Escorihuela, R.M., 2012. Physiological and behavioural consequences of long-term moderate treadmill exercise. *Psychoneuroendocrinology* 37, 1745-1754.

Lambert, T.J., Fernandez, S.M., Frick, K.M., 2005. Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 83, 206-216.

Li, V.S., Ng, S.S., Boersema, P.J., Low, T.Y., Karthaus, W.R., Gerlach, J.P., Mohammed, S., Heck, A.J., Maurice, M.M., Mahmoudi, T., Clevers, H., 2012. Wnt signaling through inhibition of β -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell* 149, 1245-1256.

Lie, D.C., Colamarino, S.A., Song, H.J., Désiré, L., Mira, H., Consiglio, A., Lein, E.S., Jessberger, S., Lansford, H., Dearie, A.R., Gage, F.H., 2005. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* 437, 1370-1375.

Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., He, X., 2002. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108, 837-847.

Lustig, B., Jerchow, B., Sachs, M., Weiler, S., Pietsch, T., Karsten, U., van de Wetering, M., Clevers, H., Schlag, P.M., Birchmeier, W., Behrens, J., 2002. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1184-1193.

Maiese, K., Li, F., Chong, Z.Z., Shang, Y.C., 2008. The Wnt signaling pathway: aging gracefully as a protectionist? *Pharmacol. Ther.* 118, 58-81.

Middleton, L.E., Barnes, D.E., Lui, L.Y., Yaffe, K., 2010. Physical activity over the life course and its association with cognitive performance and impairment in old age. *J. Am. Geriatr. Soc.* 58, 1322-1326.

Mustroph, M.L., Chen, S., Desai, S.C., Cay, E.B., DeYoung, E.K., Rhodes, J.S., 2012. Aerobic exercise is the critical variable in an enriched environment that increases hippocampal neurogenesis and water maze learning in male C57BL/6J mice. *Neuroscience* 219, 62-71.

Nemati Karimooy, H., Hosseini, M., Nemati, M., Esmaily, H.O., 2012. Lifelong physical activity affects mini mental state exam scores in individuals over 55 years of age. *J. Bodyw. Mov. Ther.* 16, 230-235.

Nithianantharajah, J., Hannan, A.J., 2009. The neurobiology of brain and cognitive reserve: mental and physical activity as modulators of brain disorders. *Prog. Neurobiol.* 89, 369-382.

O'Callaghan, R.M., Griffin, E.W., Kelly, A.M., 2009. Long-term treadmill exposure protects against age-related neurodegenerative change in the rat hippocampus. *Hippocampus* 19, 1019-1029.

Pallàs, M., Verdaguer, E., Tajés, M., Gutierrez-Cuesta, J., Camins, A., 2008. Modulation of sirtuins: new targets for antiageing. *Recent Pat. CNS Drug Discov.* 3, 61-69.

Pasco, M.Y., Catoire, H., Parker, J.A., Brais, B., Rouleau, G.A., Néri, C., 2010. Cross talk between canonical Wnt signaling and the sirtuin-FoxO longevity pathway to protect against muscular pathology induced by mutant PABPN1 expression in *C. elegans*. *Neurobiol. Dis.* 38, 425-433.

Purro, S.A., Dickins, E.M., Salinas, P.C., 2012. The secreted Wnt antagonist Dickkopf-1 is required for amyloid β -mediated synaptic loss. *J. Neurosci.* 32, 3492-3498.

Rosi, M.C., Luccarini, I., Grossi, C., Fiorentini, A., Spillantini, M.G., Prisco, A., Scali, C., Gianfriddo, M., Caricasole, A., Terstappen, G.C., Casamenti, F., 2010. Increased Dickkopf-1 expression in transgenic mouse models of neurodegenerative disease. *J. Neurochem.* 112, 1539-1551.

Scali, C., Caraci, F., Gianfriddo, M., Diodato, E., Roncarati, R., Pollio, G., Gaviraghi, G., Copani, A., Nicoletti, F., Terstappen, G.C., Caricasole, A., 2006. Inhibition of Wnt signaling, modulation of Tau phosphorylation and induction of neuronal cell death by DKK1. *Neurobiol. Dis.* 24, 254-265.

Seib, D.R., Corsini, N.S., Ellwanger, K., Plaas, C., Mateos, A., Pitzer, C., Niehrs, C., Celikel, T., Martin-Villalba, A., 2013. Loss of Dickkopf-1 restores neurogenesis in old age and counteracts cognitive decline. *Cell Stem Cell* 12, 204-214.

Smith, P.J., Blumenthal, J.A., Hoffman, B.M., Cooper, H., Strauman, T.A., Welsh-Bohmer, K., Browndyke, J.N., Sherwood, A., 2010. Aerobic exercise and neurocognitive performance: a meta-analytic review of randomized controlled trials. *Psychosom. Med.* 72, 239-252.

Spencer, J.P., 2008. Food for thought: the role of dietary flavonoids in enhancing human memory, learning and neuro-cognitive performance. *Proc. Nutr. Soc.* 67, 238-252.

Stranahan, A.M., Khalil, D., Gould, E., 2007. Running induces widespread structural alterations in the hippocampus and entorhinal cortex. *Hippocampus* 17, 1017-1022.

Stranahan, A.M., Lee, K., Becker, K.G., Zhang, Y., Maudsley, S., Martin, B., Cutler, R.G., Mattson, M.P., 2010. Hippocampal gene expression patterns underlying the enhancement of memory by running in aged mice. *Neurobiol. Aging* 31, 1937-1949.

Tajiri, N., Yasuhara, T., Shingo, T., Kondo, A., Yuan, W., Kadota, T., Wang, F., Baba, T., Tayra, J.T., Morimoto, T., Jing, M., Kikuchi, Y., Kuramoto, S., Agari, T., Miyoshi, Y., Fujino, H., Obata, F., Takeda, I., Furuta, T., Date, I., 2010. Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats. *Brain Res.* 1310, 200-207.

Taurin, S., Sandbo, N., Qin, Y., Browning, D., Dulin, N.O., 2006. Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 281, 9971-9976.

Um, H.S., Kang, E.B., Koo, J.H., Kim, H.T., Jin-Lee, Kim, E.J., Yang, C.H., An, G.Y., Cho, I.H., Cho, J.Y., 2011. Treadmill exercise represses neuronal cell death in an aged transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci. Res.* 69, 161-173.

van Praag, H., 2009. Exercise and the brain: something to chew on. *Trends Neurosci.* 32, 283-290.

Vaynman, S.S., Ying, Z., Yin, D., Gomez-Pinilla, F., 2006. Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. *Brain Res.* 1070, 124-130.

Venturelli, M., Scarsini, R., Schena, F., 2011. Six-month walking program changes cognitive and ADL performance in patients with Alzheimer. *Am. J. Alzheimers Dis. Other Demen.* 26, 381-388.

Vivar, C., Potter, M.C., van Praag, H., 2012. All about running: synaptic plasticity, growth factors and adult hippocampal neurogenesis. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 15, 189-210.

Wang, J., Shou, J., Chen, X., 2000. Dickkopf-1, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, is induced by p53. *Oncogene* 19, 1843-1848.

Wu, C.W., Chang, Y.T., Yu, L., Chen, H.I., Jen, C.J., Wu, S.Y., Lo, C.P., Kuo, Y.M., 2008. Exercise enhances the proliferation of neural stem cells and neurite growth and survival of neuronal progenitor cells in dentate gyrus of middle-aged mice. *J. Appl. Physiol.* 105, 1585-1594.

Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R., Okamura, H., Woodgett, J., He, X., 2005. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* 438, 873-877.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Representative images of dentate gyrus regions stained with Dkk-1 (20x magnification) from sedentary (SED), treadmill control (NoEXE) and exercised (EXE) animals (A). The dentate gyrus of SED animals produced a stronger signal than the other groups, the EXE group showing the lowest immunoreactivity for Dkk-1.

Dkk-1 protein levels in the hippocampus of sedentary (SED), treadmill control (NoEXE) and exercised (EXE) rats (B). Images show representative Western blots and bar graphs obtained from semi-quantitative image analysis, as described in the Experimental Procedures. Results are mean \pm SEM of 5–6 independent experiments. * $p < 0.05$ vs. SED.

Figure 2: p-LRP6, LRP6 (A) and Axin1 protein levels (B) in hippocampus of sedentary (SED), treadmill control (NoEXE) and exercised (EXE) rats. Images show representative Western blots and bar graphs obtained from semi-quantitative image analysis, as described in the Experimental Procedures. Results are mean \pm SEM of 5–6 independent experiments. * $p < 0.05$ vs. SED.

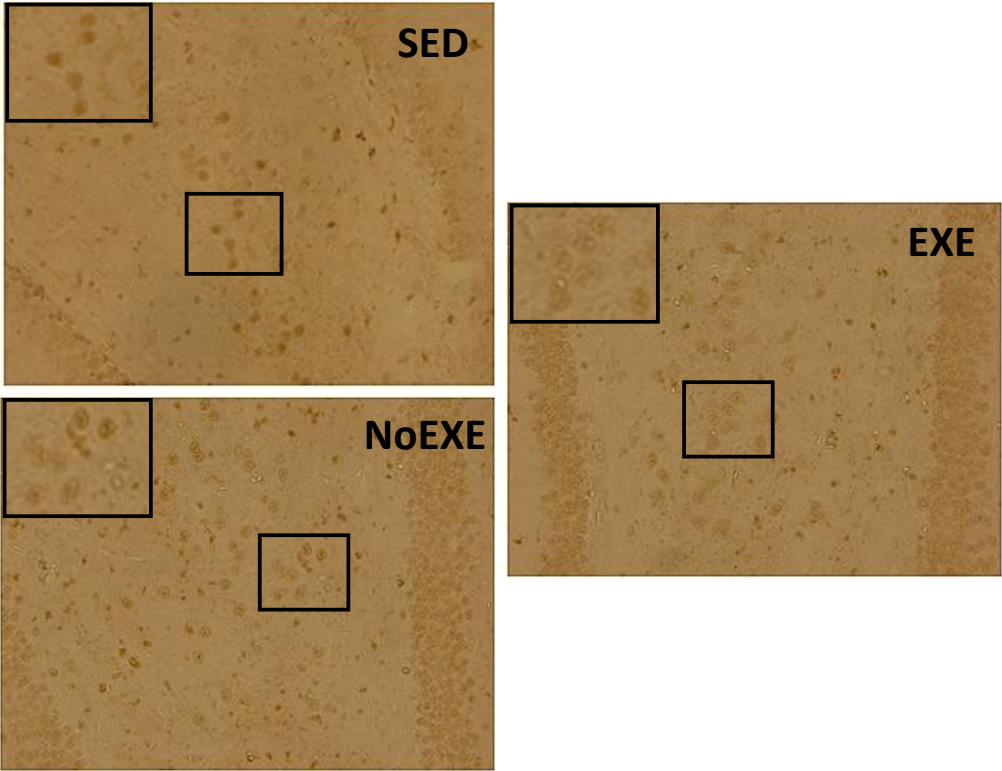
Figure 3: p-GSK-3 α/β Tyr279/216 activation in hippocampus of sedentary (SED), treadmill control (NoEXE) and exercised (EXE) rats. Images show representative Western blots and bar graphs obtained from semi-quantitative image analysis, as described in the Experimental Procedures. Results are mean \pm SEM of 5–6 independent experiments. ** $p < 0.01$ vs. SED.

Figure 4: Different phosphorylated forms of β -catenin and total β -catenin protein levels (A-D) in hippocampus of sedentary (SED), treadmill control (NoEXE) and exercised (EXE) rats. Images show representative Western blots and bar graphs obtained from semi-quantitative image analysis, as described in the Experimental Procedures. Results are mean \pm SEM of 5–6 independent experiments.

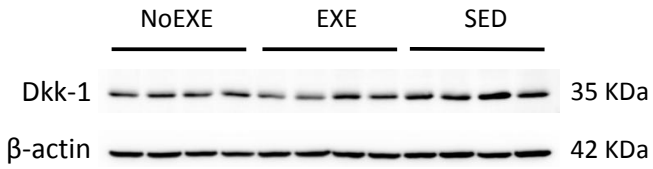
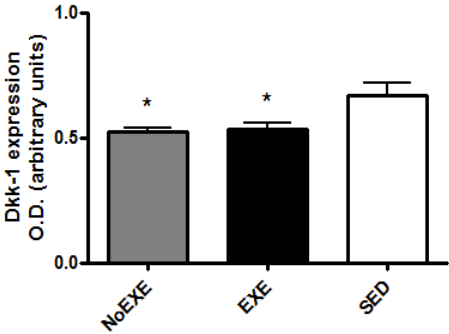
Figure 5: Axin2 (A), Bax (B) and Bcl-2 (C) protein levels in hippocampus of sedentary (SED), treadmill control (NoEXE) and exercised (EXE) rats. Images show representative Western blots and bar graphs obtained from semi-quantitative image analysis, as described in the Experimental Procedures. Results are mean \pm SEM of 5–6 independent experiments. * $p < 0.05$ vs. SED.

Bayod et al., Figure 1

A

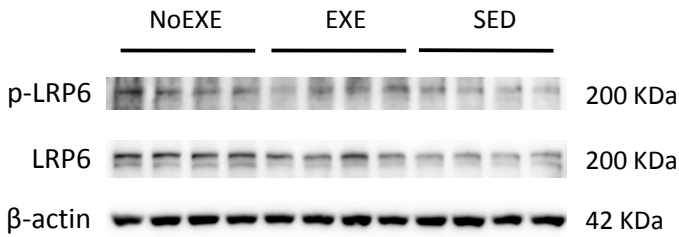
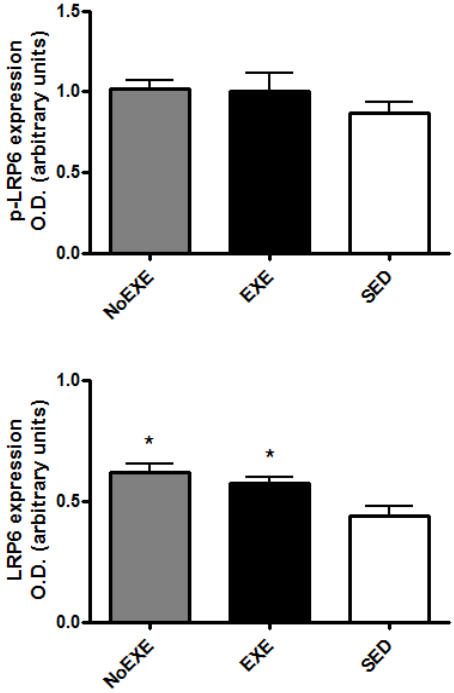


B

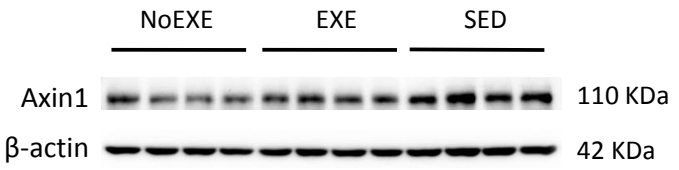
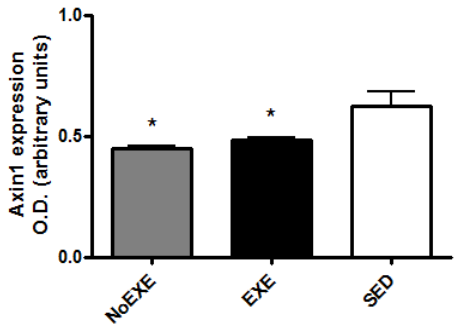


Bayod et al., Figure 2

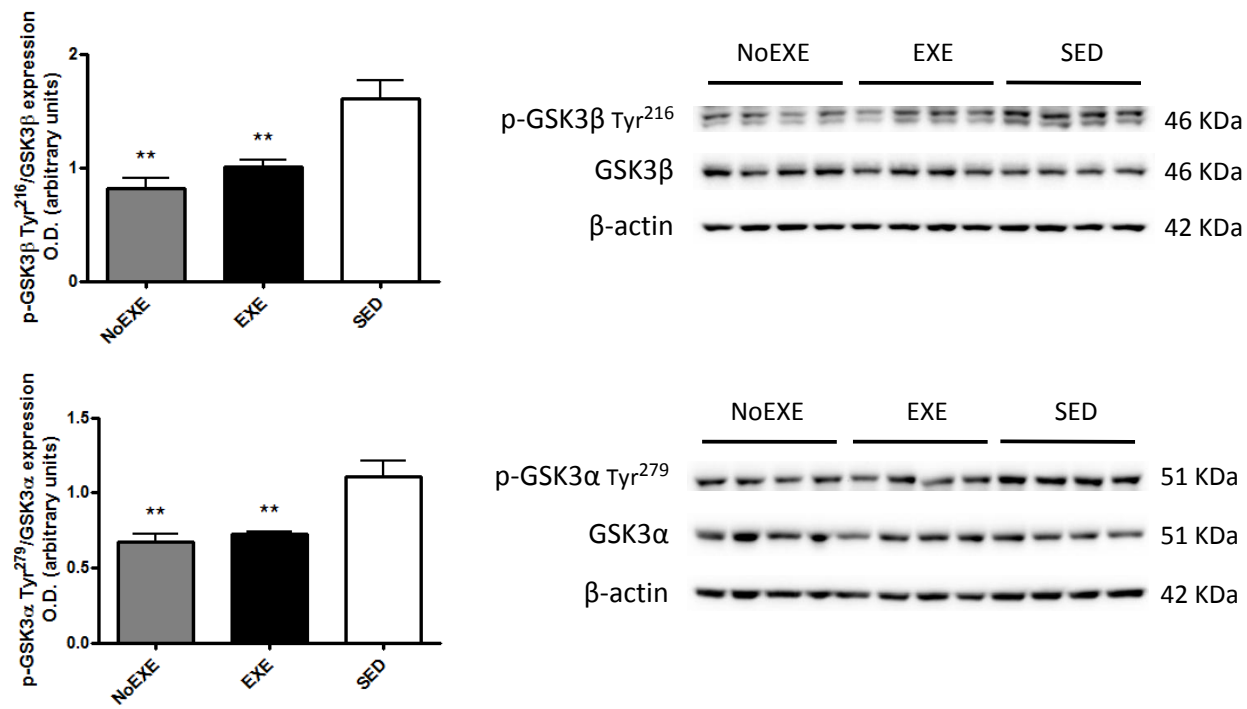
A



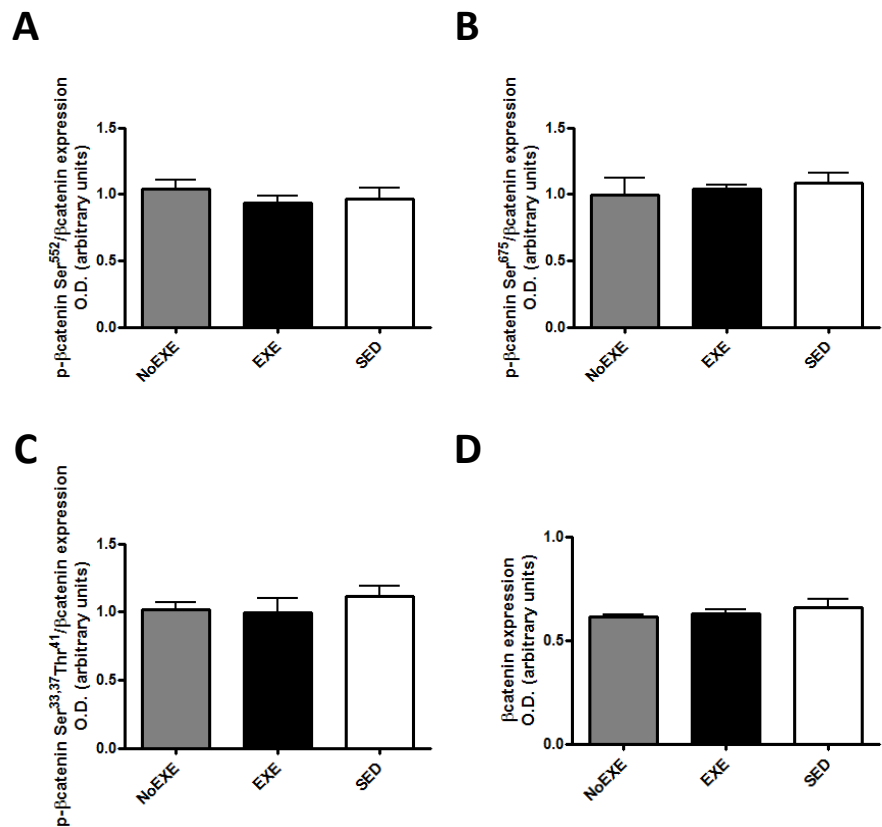
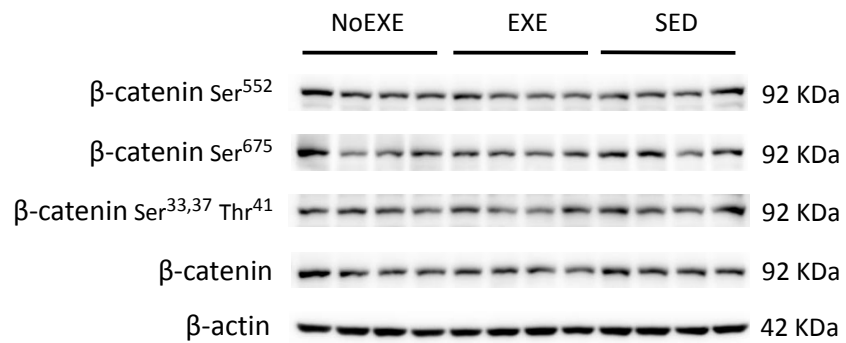
B



Bayod et al., Figure 3

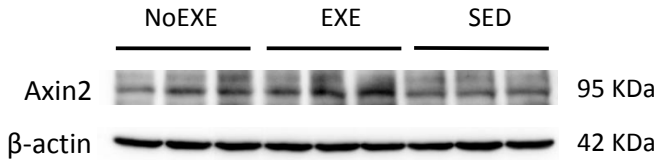
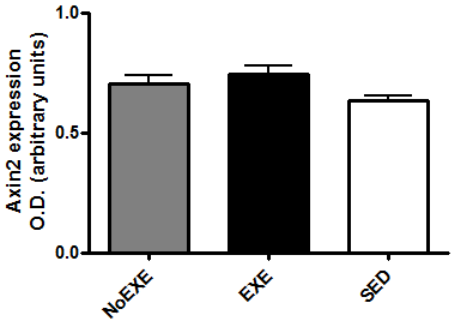


Bayod et al., Figure 4

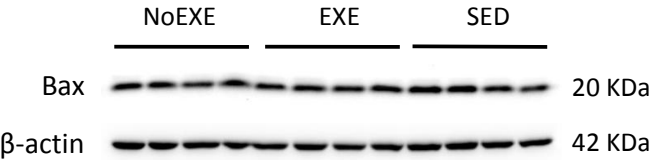
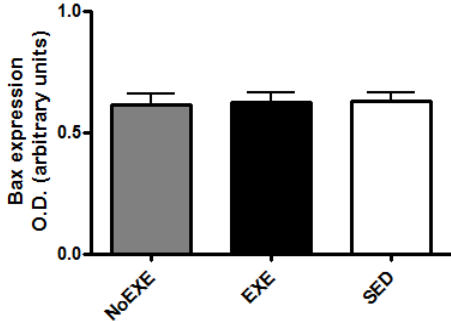


Bayod et al., Figure 5

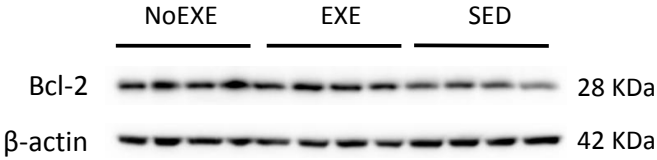
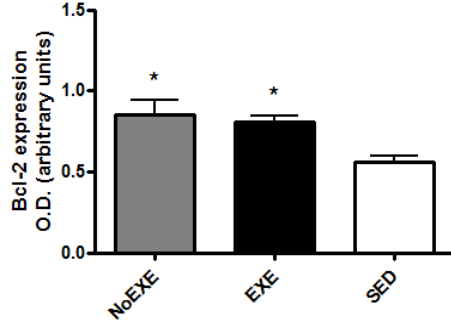
A



B



C



DISCUSSIÓ

El procés d'envelliment, agrupa al conjunt de canvis fisiològics i anatòmics que es desenvolupen en l'edat adulta, els quals produiran un deteriorament de les funcions fisiològiques, incrementant el risc d'emmalaltir. Al conjunt dels factors inherents al propi organisme responsables d'envellir (envelliment primari), s'han de sumar els factors adversos de l'entorn (com l'estil de vida i la nutrició), responsables de l'envelliment secundari. Ambdós conduiran al deteriorament funcional de l'organisme, desencadenant en l'evolució de malalties (Blagosklonny, 2007; Hung et al., 2010).

Nombroses són les causes d'aquest procés: el deteriorament de la funció mitocondrial, l'escurçament dels telòmers, la reducció dels sistemes de reparació del DNA, la pèrdua de cèl·lules irremplaçables junt amb el descens de la regeneració tissular (Sahin i Depinho, 2010). A les anteriors causes, s'ha de sumar l'estrès oxidatiu, entenent a aquest com un augment en la cèl·lula dels nivells de ROS. I és aquesta situació d'estrès oxidatiu retroalimentada per la disfunció mitocondrial que produirà un dany oxidatiu de proteïnes, lípids i DNA. Tot això produirà alteracions en la viabilitat cel·lular i la mort de la cèl·lula, conduint així al desenvolupament de malalties neurodegeneratives i d'altres relacionades amb l'envelliment (Bishop et al., 2010; Dasuri et al., 2012; Marchi et al., 2012).

Fa més de 500 anys, un explorador espanyol, Ponce de León, va partir de Puerto Rico a la recerca d'or i de la mítica font de l'eterna joventut, que mai va trobar. En l'actualitat, científics de tot el món, segueixen buscant maneres i molècules capaces de modular el procés d'envelliment. Si bé a compostos com el resveratrol se li han atribuït tot un conjunt d'efectes beneficiosos per a la salut, inclús l'augment de l'esperança de vida, actualment, s'està a l'espera que els resultats dels assaigs clínics confirmen aquestes propietats (Orallo, 2008). A dia d'avui, la pràctica d'exercici físic aeròbic, -com pot ser caminar, córrer, anar en bicicleta o nadar-, podríem considerar-la com a aquesta font de l'eterna joventut de la qual podem beure els humans. Són nombrosos els beneficis que té associat l'exercici, actuant sobre diversos sistemes fisiològics, tant a nivell perifèric com a nivell cerebral (Cotman et al., 2007). Així, a nivell perifèric, l'exercici físic disminueix el risc de desenvolupar malaltia coronària, hipertensió, diabetis de tipus II i alguns tipus de càncer com el de colon i pulmó (Garber et al., 2011; Gremeaux et al., 2012). A nivell cerebral, prevé i millora trastorns depressius i d'ansietat, millora les funcions intel·lectuals i s'ha associat amb una disminució del risc de patir deteriorament cognitiu i demència (Ahlskog et al., 2011; Garber et al., 2011; van Praag, 2009). A més, en adults i en persones

d'edat avançada, millora el deteriorament cognitiu associat a l'envelliment (Nemati Karimooy et al., 2012; Smith et al., 2010) i a malalties neurodegeneratives (Kemoun et al., 2010; Venturelli et al., 2011).

Malgrat conèixer els efectes beneficiosos de l'exercici físic, les vies moleculars implicades no estan ben establertes. És per això que en aquesta tesi doctoral s'ha volgut estudiar a nivell cerebral (hipocamp i còrtex cerebral) i a nivell perifèric (múscul esquelètic, fetge i cor) en rates mascle Sprague-Dawley als 10 mesos de vida (rates adultes) el procés d'envelliment (establint un grup control de rates joves de 8 setmanes de vida) sobre algunes de les vies moleculars que s'han relacionat i resulten alterades amb l'edat, com són la via de sirtuïna 1, el procés d'autofàgia i la via Wnt (via canònica). D'altra banda, s'ha avaluat la possible modulació de les anteriors vies amb la realització d'exercici físic moderat de llarg termini (dut a terme durant 36 setmanes des de les 5 setmanes de vida, 4-5 dies a la setmana, durant 30 minuts al dia). A més, vist que alguns autors observen canvis amb l'enriquiment ambiental i la manipulació dels animals, s'ha considerat interessant l'estudi d'aquesta última.

1. Estudi de la via de sirtuïna 1 i la biogènesi mitocondrial a nivell cerebral i perifèric (Publicació 1, Publicació 2)

La via de sirtuïna 1 es troba regulant vies relacionades amb la supervivència cel·lular, a més de regular la biogènesi mitocondrial. Considerant que durant l'envelliment es produeix una disfunció mitocondrial, com a primer objectiu en aquesta tesi doctoral ens vam proposar estudiar aquests processos: per una banda, a nivell de l'hipocamp i el còrtex cerebral, dues de les principals zones cerebrals afectades en les malalties neurodegeneratives i les quals estan implicades en processos d'aprenentatge i memòria; i d'altra banda, a nivell perifèric, en el múscul esquelètic, el fetge i el cor.

Un punt a considerar és l'edat que tenien els animals un cop van finalitzar l'estudi. Si se sap que les rates Sprague-Dawley viuen de mitjana 25 mesos (Cameron et al., 1982), un dels plantejaments d'aquesta tesi doctoral era estudiar l'efecte que tindria la realització de l'exercici físic des de joves (5 setmanes en els nostres animals) fins a l'edat adulta (10 mesos). Aquest hàbit sinònim d'un estil de vida saludable, realitzat amb l'objectiu de prevenir i/o retardar el deteriorament fisiològic associat a l'envelliment. A més, a nivell

cerebral, caldria fer referència al terme conegut com a reserva cognitiva, i on la realització d'exercici físic des que un és jove confereix una major resistència al cervell al deteriorament degut a l'edat (Middleton et al., 2010; Nithianantharajah i Hannan, 2009).

Els nivells d'IGF-1 van ser un dels primers paràmetres mesurats. Es coneix que aquest factor neurotròfic intervé a nivell cerebral en el procés de neurogènesi (Trejo et al., 2008), i en la via de senyalització de la insulina tant a nivell central com a nivell perifèric (Taguchi i White, 2008). Igual que van determinar Koltai et al. (2011), els nostres resultats mostren un descens dels nivells proteics d'IGF-1 amb l'edat. L'exercici (grup EXE), -i en menor mesura també en el grup de rates manipulades (NoEXE)-, va revertir aquest descens fins a uns nivells semblants al grup de rates joves (YOUNG). Llorens-Martín et al. (2010) també van establir en sèrum un augment dels nivells d'IGF-1 amb l'exercici. D'altra banda, altres autors destaquen la importància de la capacitat de l'exercici físic d'estimular el pas d'IGF-1 des de la perifèria cap a diferents zones cerebrals, arribant així a l'hipocamp on estimularia el procés de neurogènesi. Així, al bloquejar el pas d'IGF-1 a nivell central (Trejo et al., 2001) o en ratolins mutants deficients d'IGF-1 (Trejo et al., 2008), es redueix la formació de noves neurones junt amb un deteriorament de la capacitat d'aprenentatge. D'altra banda, es coneix que la inhibició de la via d'IGF-1/insulina per RC en rosegadors, seria un dels mecanismes pel qual la RC augmentaria l'esperança de vida, malgrat presentar alterada la sensibilitat a la insulina (Avogaro et al., 2010; Taguchi i White, 2008).

L'altra proteïna implicada en l'augment de l'esperança de vida per RC en diferents espècies seria la sirtuïna 1 (Guarente, 2007). Diferents estudis mostren com l'exercici físic incrementa els seus nivells proteics tant a nivell cerebral (Falone et al., 2012; Gomez-Pinilla i Ying, 2010), com en el múscul esquelètic i en el fetge (E et al., 2013; Suwa et al., 2008). D'una banda, els nostres resultats mostren una davallada dels nivells d'aquesta desacetilasa en l'hipocamp amb l'edat, tal i com van determinar altres autors (Koltai et al., 2011). D'altra banda, la realització d'exercici va produir un augment de SIRT1 en el còrtex i en l'hipocamp fins a uns nivells similars al grup YOUNG, confirmant així els resultats obtinguts pels autors citats prèviament. També en menor grau es va observar un augment de SIRT en el grup NoEXE. Aquest increment dels nivells de SIRT1 va anar acompanyat per un augment de la seva activitat. Així, en ambdós grups experimentals (EXE i NoEXE) es va determinar un descens dels nivells d'acetilació de la diana de SIRT1, p53 (i per tant,

disminució de la seva activitat proapoptòtica), tant en còrtex com en hipocamp; sent aquest descens més important en el còrtex del grup EXE. A nivell perifèric, també es va establir un augment dels nivells de SIRT1 amb l'exercici en el múscul esquelètic, el fetge i el cor, junt amb una disminució dels nivells de p53 acetilada en múscul i fetge. Com prèviament hem explicat en la introducció, NAMPT és l'enzim limitant de la síntesi de NAD^+ , regulant així l'activitat de SIRT1 (Zhang et al., 2011). Per tant, vam voler estudiar si l'augment d'activitat de SIRT1 observat en el grup d'animals entrenats, podria ser degut a un efecte de l'exercici sobre els nivells de NAMPT. Els nostres resultats no mostren canvis en el còrtex i l'hipocamp amb l'envelliment ni tampoc amb l'exercici o la manipulació. Tan sols a nivell muscular es va determinar un augment en el grup EXE, -igual que van observar Costford et al. (2010) en humans-, fet que podria contribuir de manera addicional a l'augment de l'activitat de SIRT1 en el múscul esquelètic.

Cal dir que SIRT1 regula la via d'IGF-1, augmentant la sensibilitat a la insulina. D'altra banda, l'expressió de SIRT1 es redueix en condicions de resistència a la insulina (Sun et al., 2007) i també amb l'administració d'insulina (Cohen et al., 2004). Així, l'augment tant dels nivells proteics de SIRT1 com de la seva activitat, -determinats ambdós a nivell cerebral i perifèric-, podria estar relacionat amb els nivells més baixos de glucosa plasmàtica mesurats en aquests animals en condicions de repòs (Lalanza et al., 2012. Annex 1).

El següent punt a considerar és l'eix SIRT1-AMPK-PGC-1 α , on l'activació final de PGC-1 α promourà l'expressió de gens que codifiquen per subunitats de la cadena respiratòria mitocondrial, gens relacionats amb el metabolisme energètic i també que codifiquen per a enzims antioxidants (Cantó i Auwerx, 2009; Scarpulla, 2011).

Els nostres resultats mostren a nivell central una activació d'AMPK amb l'exercici, ja que es va determinar de manera exclusiva en aquest grup un augment dels nivells proteics d'AMPK α fosforilada. Quant a PGC-1 α , sols es van mesurar canvis en còrtex, on es van mesurar uns nivells més baixos en els tres grups de rates adultes (SED, NoEXE i EXE). En aquest cas, l'exercici va augmentar els nivells de PGC-1 α (això sí, sense arribar als nivells del grup YOUNG) i de manera menys intensa també es van incrementar en el grup NoEXE. Quant als nivells dels diferents complexos de la cadena respiratòria mitocondrial (sistema OXPHOS), alguns d'ells van augmentar tant en l'hipocamp com en el còrtex cerebral dels animals entrenats. Aquest resultat, junt amb un major marcatge de la

proteïna mitocondrial prohibitina a nivell del gir dentat de l'hipocamp, confirmen l'activació de la biogènesi mitocondrial a nivell cerebral amb l'exercici, tal i com indiquen altres autors (Steiner et al., 2011; Zhang et al., 2012).

A nivell perifèric, es va determinar una davallada dels nivells d'AMPK α fosforilada amb l'edat en el múscul esquelètic i en el fetge, fet que ni l'exercici ni tampoc la manipulació dels animals va revertir. Pel que fa als nivells de PGC-1 α , aquests van incrementar amb l'exercici en els tres teixits estudiats (en múscul esquelètic també van augmentar en el grup NoEXE). En canvi, sols es va mesurar un augment d'alguns dels complexos del sistema OXPHOS en el múscul esquelètic de les rates entrenades; i en alguns casos, aquest increment estava relacionat amb l'envelliment dels animals.

Per tant, els nostres resultats anirien en línia amb els obtinguts per altres estudis on s'estableix la implicació de l'eix SIRT1-AMPK-PGC-1 α en la biogènesi mitocondrial i com aquesta es pot induir amb la pràctica d'exercici moderat de llarg termini tant a nivell cerebral (Wareski et al., 2009) com a nivell perifèric (Haase et al., 2011; Suwa et al., 2008). D'aquesta manera, es faria front a la disfunció mitocondrial observada en l'envelliment i en les malalties neurodegeneratives i metabòliques (Lagouge et al., 2006; Lin i Beal, 2006) (Figura 15).

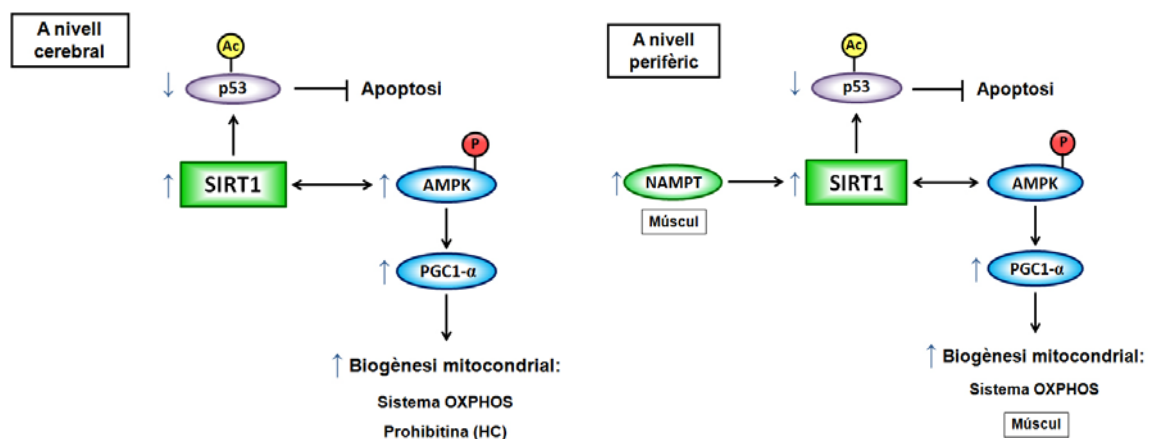


Figura 15. Esquemes generals dels efectes de l'exercici físic a nivell cerebral i a nivell perifèric sobre la via de SIRT1 i la biogènesi mitocondrial.

(Veure en el text els efectes que tenen lloc de manera específica en els diferents òrgans i teixits estudiats).

2. Estudi del procés neurodegeneratiu (Publicació 1)

A nivell cerebral, la fosforilació de la proteïna tau produirà la desestabilització dels microtúbuls dels axons de les neurones, i s'agregarà formant els cabdells neurofibril·lars, els quals s'observen tant en persones grans no dementes com en malalts d'Alzheimer i altres tautopaties (Hanger et al., 2009; Nelson et al., 2012). GSK-3 β és una de les cinases que fosforilarà a tau, la qual se sap que és activada per l'estrès oxidatiu fosforilant-se en el residu de tirosina 216 (Jope et al., 2007; Lovell et al., 2004; Cho i Johnson, 2003). D'altra banda, durant l'envelliment i també en les malalties neurodegeneratives, es produeix una pèrdua de sinapsis i d'espines dendrítiques. Aquest fet, junt amb el descens de proteïnes que participen en la sinapsi com la sinaptofisina (Bishop et al., 2010; Esiri, 2007; Reddy et al., 2005; Shimada et al., 2003), podrien estar relacionats amb el deteriorament durant l'envelliment de la capacitat per aprendre noves tasques (van Praag, 2009).

Els nostres resultats mostren una activació de GSK-3 β amb l'edat, on es van determinar uns nivells més alts d'aquesta cinasa fosforilada en el residu de tirosina 216. Aquest fet es va correlacionar amb uns nivells més alts de la proteïna tau fosforilada en el residu de serina 396. L'exercici físic i també la manipulació van reduir l'activació de GSK-3 β tan sols en l'hipocamp. En canvi, els nivells de tau fosforilada sols van disminuir en el grup EXE fins a nivells semblants al grup d'animals joves. Altres autors també van determinar un descens de la fosforilació de tau amb l'exercici (Belarbi et al., 2011; Um et al., 2011). Mentre que Um et al. (2011) estableixen que la reducció de la fosforilació de tau vindria mediada per una menor activació de GSK-3 β , Belarbi et al. (2011) proposen que seria l'estimulació del mecanisme d'autofàgia mediat pels lisosomes el responsable de l'eliminació de tau. Aquests últims no descarten la possible modulació de fosfatases amb l'exercici com a reguladores dels nivells de tau fosforilada. Així doncs, en el nostre estudi, tant l'exercici com la simple manipulació van reduir en l'hipocamp l'activació de GSK-3 β . En canvi, el fet que només s'observés una disminució significativa de la fosforilació de tau en el grup de rates EXE respecte als altres dos grups de rates adultes (SED i NoEXE), fa pensar que l'exercici podria estar modificant altres cinases que fosforilen a tau específicament en el residu de serina 396 (i també en d'altres), com pot ser CDK5 i CK1 (Hanger et al., 2009). D'altra banda, no solament és important considerar la fosforilació de tau, sinó que s'ha de tenir en compte l'estat d'acetilació, on el seu augment causa la

desestabilització dels microtúbuls (Cohen et al., 2011). SIRT1 interacciona amb tau i la desacetila, augmentant la seva degradació pel proteosoma (Min et al., 2010). Per tant, SIRT1 també estaria implicada en la regulació del procés neurodegeneratiu lligat a diferents malalties englobades dintre del terme tautopaties.

Quant a l'estudi de sinaptofisina, se sap que aquesta és una proteïna implicada en la biogènesi de les vesícules presinàptiques, de les quals també en forma part (Vaynman et al., 2006), i com acabem de comentar, els seus nivells resulten alterats durant l'envelliment. Els nostres resultats mostren una davallada dels nivells de sinaptofisina en el còrtex de les rates adultes sedentàries, on l'exercici i també la manipulació van revertir aquest descens fins a uns valors similars als del grup YOUNG. Lambert et al. (2005) van obtenir resultats similars en ratolins joves sotmesos a un enriquiment ambiental com en aquells que van fer exercici voluntari. D'altra banda, en l'hipocamp, no es van determinar canvis en els nivells de sinaptofisina amb l'edat. En canvi, es va observar un increment de manera específica amb l'exercici, fet que també van determinar altres autors (Cassilhas et al., 2012; Vaynman et al., 2006).

Així, l'exercici físic moderat a nivell cerebral contrarestaria alguns dels mecanismes neurodegeneratius que tenen lloc durant l'envelliment i en algunes malalties neurodegeneratives, com són l'augment de la fosforilació de la proteïna tau junt amb la disminució dels nivells de proteïnes que participen en la sinapsi com la sinaptofisina, contribuint així al manteniment de la transmissió sinàptica (Figura 16).

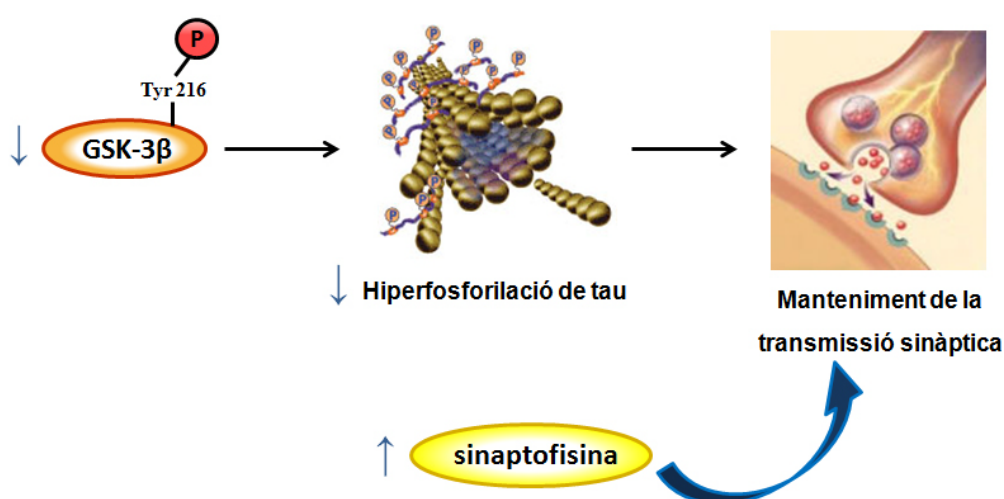


Figura 16. Esquema dels efectes de l'exercici físic a nivell cerebral sobre el procés neurodegeneratiu.

3. Estudi de l'angiogènesi, el dany oxidatiu i la maquinària antioxidant a nivell perifèric (Publicació 2)

El VEGF és un factor de creixement que regula el procés d'angiogènesi tant a nivell cerebral com a nivell perifèric, sent l'exercici capaç de modular els seus nivells (Malek et al., 2010; Olfert et al., 2009; van Praag, 2009). Els nostres resultats mostren una disminució dels nivells de VEGF amb l'edat en el fetge i en el cor (sent de manera estadísticament significativa solament a nivell cardíac), on la realització d'exercici va revertir aquest descens fins a nivells semblants al grup de rates joves. Sorprenentment, a nivell muscular es van determinar uns valors de VEGF inferiors en el grup d'animals EXE.

A nivell muscular en humans, s'observa un descens de la capil·larització i dels nivells proteics de VEGF amb l'edat, on la pràctica d'exercici és capaç d'augmentar la capil·larització junt amb la capacitat aeròbica màxima. A més, els nivells de VEGF són més alts en resposta a l'exercici en joves que en adults (Gavin et al., 2007; Ryan et al., 2006). D'altra banda, estudis en rosegadors mostren a nivell cardíac com l'exercici reverteix la disminució de la capil·larització i dels nivells de VEGF amb l'edat (Iemitsu et al., 2006). En canvi, a nivell muscular en rosegadors, malgrat no observar alteracions de la capil·larització amb l'edat, l'exercici sí que augmenta la densitat capil·lar, tot i que l'entrenament no incrementa els nivells proteics basals de VEGF (Malek et al., 2010). Cal indicar que, l'entrenament de manera regular produeix en l'individu un augment en els nivells de VEGF en resposta a l'exercici inferiors respecte a humans i rosegadors no entrenats (Malek et al., 2010; Richardson et al., 2000). Aquest fet, podria ser degut a canvis estructurals i funcionals a nivell muscular amb l'entrenament, on l'augment de la capil·larització atenuaria l'increment dels nivells de VEGF en resposta a l'exercici (Richardson et al., 2000).

Amb l'edat, el dany oxidatiu de proteïnes, lípids i DNA augmenta, observant-se aquest fet en rosegadors tant a nivell del múscul esquelètic (Cakatay et al., 2003) com en el fetge i el cor (Navarro et al., 2004), i en el múscul esquelètic en humans (Mecocci et al., 1999).

En el nostre cas, vam mesurar a nivell muscular un major dany oxidatiu de lípids i proteïnes (en aquest cas no significatiu) amb l'edat, on la realització d'exercici físic moderat va revertir-lo fins a nivells similars al grup YOUNG (en les rates manipulades,

també van disminuir els lípids oxidats). En el fetge, es van determinar uns nivells més baixos de proteïnes carbonilades amb l'exercici. Finalment, a nivell cardíac, els nostres resultats indiquen un augment del dany oxidatiu proteic amb l'edat, i de manera més accentuada, en el grup d'animals EXE. Tant en el fetge com en el cor, no es van establir canvis en l'oxidació de lípids ni amb l'edat ni tampoc amb l'exercici o la manipulació.

Diferents autors també van determinar un descens del dany oxidatiu amb l'exercici (Lambertucci et al., 2007; Navarro et al., 2004; Radák et al., 2002). El fet d'observar principalment a nivell muscular un descens de l'oxidació de proteïnes i lípids amb l'exercici, quan en els altres teixits no es van establir canvis amb l'edat ni tampoc amb l'exercici (exceptuant l'oxidació de proteïnes en fetge), podria estar relacionat amb l'edat dels nostres animals. Si recordem, els nostres animals tenien 10 mesos al final de l'experiment, considerades per tant unes rates adultes, on possiblement el dany oxidatiu en el fetge i el cor no seria del tot evident a aquesta edat, tal i com han observat altres autors (Radák et al., 2004). Quant a l'augment en els nivells de proteïnes carbonilades amb l'exercici a nivell cardíac, aquest podria estar relacionat amb un descens del procés d'eliminació, ja que es coneix que les proteïnes oxidades són més resistents a la seva eliminació pel proteosoma i alhora l'inhibeixen (Pinho et al., 2006; Shringarpure i Davies, 2002).

Si parlem de dany oxidatiu, caldria fer referència als enzims antioxidants encarregats de prevenir-lo; en concret, els dos enzims estudiats en aquesta tesi doctoral: la superòxid dismutasa (Cu,Zn-SOD; l'anomenaré simplement com a SOD) i la catalasa (CAT).

El nostres resultats van mostrar en múscul esquelètic uns nivells proteics de SOD més alts en els tres grups de rates adultes. A més, el grup d'exercici va presentar un augment estadísticament significatiu respecte a sedentàries. Tant en el fetge com en el cor, els nivells de SOD no van variar entre els diferents grups experimentals. Pel que fa a l'activitat enzimàtica de SOD, sols es va determinar un petit augment en el fetge de les rates NoEXE i EXE, ambdues respecte al grup de rates joves. Quant als resultats de CAT, igual que en el cas anterior, es va observar un increment dels nivells proteics amb l'edat i de manera més marcada amb l'exercici. En els altres teixits, els nivells de CAT tampoc van variar entre els diferents grups. I finalment, pel que fa a l'activitat de CAT, es va produir

una davallada a nivell cardíac en el grup de rates entrenades, fet que podria estar relacionat amb l'augment en els nivells de proteïnes oxidades mesurat en aquest grup.

L'extensa literatura que hi ha referent als efectes de l'exercici físic i l'expressió, nivells proteics i activitat enzimàtica dels enzims antioxidants estudiats (SOD i CAT) a nivell muscular, fa difícil establir una relació causa-efecte específica entre aquests i l'exercici (Boveris i Navarro, 2008b; Ji, 2008; Lambertucci et al., 2007; Pinho et al., 2006). Així, l'augment en els nivells proteics tant de SOD com de CAT a nivell muscular en els tres grups de rates adultes, podria ser més una resposta de l'organisme a l'augment de l'estrès oxidatiu (i conseqüentment, del dany oxidatiu) que es produeix en l'envelliment (Lambertucci et al., 2007). El petit augment d'activitat de SOD amb l'exercici a nivell hepàtic, també va ser observat per altres autors (Navarro et al., 2004); i on igual que en el nostre cas, Haase et al. (2011) tampoc van determinar un augment dels nivells de SOD amb l'entrenament. Pel que fa a la CAT, Navarro et al. (2004), si que van demostrar a nivell hepàtic com l'exercici físic recuperava el descens d'activitat produït en l'envelliment. D'altra banda a nivell cardíac, s'han establert resultats dispars pel que fa als efectes de l'exercici i l'envelliment sobre la CAT i la SOD: Ferrara et al. (2008) no van observar canvis en els nivells de SOD amb l'edat, però si en els nivells de CAT, els quals van disminuir, sent l'exercici capaç d'augmentar els nivells d'ambdós. Navarro et al. (2004) van determinar una menor activitat d'ambdós enzims amb l'edat, on la realització d'exercici va aconseguir revertir el descens d'activitat sols de SOD. Finalment, Siu et al. (2011) no van observar canvis en l'activitat de SOD i CAT ni amb l'edat ni amb l'exercici. En el nostre cas, amb un règim d'exercici moderat, no es van observar canvis en els nivells proteics de SOD i CAT a nivell cardíac, i únicament va variar l'activitat de CAT, disminuint en el grup de rates entrenades.

Per últim, caldria fer referència als resultats obtinguts per la tècnica del FRAP (de l'anglès, *ferric reducing ability of plasma*, o també *ferric reducing antioxidant power*). Aquesta és una tècnica que s'utilitza per mesurar la capacitat antioxidant no enzimàtica d'una mostra biològica (plasma i teixits) i també d'extractes de plantes (Benzie i Strain, 1996; Katalinic et al., 2005). Els resultats en plasma, múscul i cor no van mostrar variacions de la capacitat antioxidant entre els diferents grups experimentals, igual com no en van determinar altres autors en plasma ni amb l'edat ni amb l'exercici (Siu et al., 2011). En canvi, a nivell hepàtic, vam obtenir uns valors més alts en el grup de rates manipulades

respecte a sedentàries, i de manera més accentuada en el grup de rates entrenades, el que seria indicatiu d'una major protecció enfront del dany oxidatiu en el fetge d'aquests animals. Així doncs, l'augment de la capacitat antioxidant no enzimàtica junt amb una major activitat enzimàtica de SOD, podria estar contribuint al descens del dany oxidatiu proteic observat en el fetge amb l'exercici.

Per tant, els resultats obtinguts en aquest apartat mostren com la pràctica d'exercici físic moderat realitzat de manera regular augmenta en el múscul esquelètic els nivells dels enzims antioxidants SOD i CAT, reduint així el dany oxidatiu lligat a l'envelliment en aquest teixit. En general, els resultats en cor i fetge mostren una manca d'efecte de l'exercici de llarg termini sobre els enzims antioxidants i el dany oxidatiu. L'exercici físic a l'augmentar els nivells del factor VEGF en fetge i cor, podria estar estimulant el procés angiogènic en aquests òrgans (Figura 17).

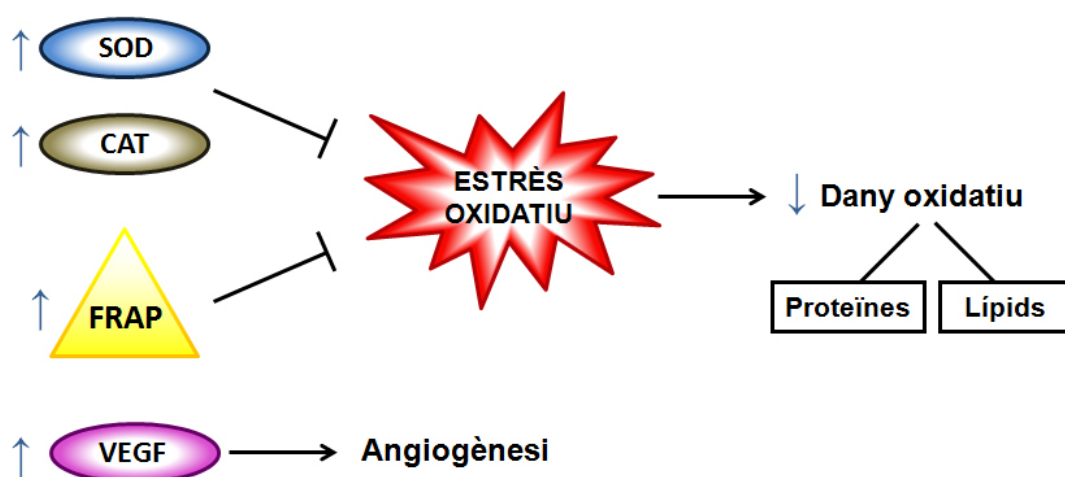


Figura 17. Esquema general dels efectes de l'exercici físic a nivell perifèric sobre la maquinària antioxidant i el dany oxidatiu, i els nivells de VEGF.

4. Estudi del mecanisme d'autofàgia (macroautofàgia) a nivell cerebral i perifèric (Publicació 3)

Les cèl·lules requereixen d'un equilibri entre els processos de biosíntesi i catabòlics, amb l'objectiu de mantenir l'homeòstasi. Quant als mecanismes de degradació, les cèl·lules eucariotes disposen de dos tipus: el proteosoma (*UPS*) i l'autofàgia. Ambdós eliminen proteïnes defectuoses, però només l'autofàgia és capaç d'eliminar orgànuls sencers i microorganismes. Es coneix que durant l'envelliment es produeix un mal funcionament d'aquests sistemes. Aquest fet desencadenarà un deteriorament funcional tant a nivell cerebral com en teixits i òrgans perifèrics, i tot plegat, contribuirà al desenvolupament de malalties neurodegeneratives, malalties metabòliques i disfunció cardíaca (Caballero i Coto-Montes, 2012; Laplante i Sabatini, 2012; Levine i Kroemer, 2008; Mizushima i Komatsu, 2011; Rezzani et al., 2012; Salminen i Kaarniranta, 2009).

Hi ha tres tipus d'autofàgia (la macroautofàgia, la microautofàgia i l'autofàgia mediada per xaperones) (Mizushima i Komatsu, 2011), sent la macroautofàgia l'estudiada en aquesta tesi doctoral (jo em referiré simplement com a autofàgia).

Tant el sistema UPS com l'autofàgia eliminen proteïnes ubiquitinitzades, però aquelles de vida llarga i les que formen agregats seran eliminades preferentment pel procés d'autofàgia (Korolchuk et al., 2010; Tan et al., 2008a, 2008b). D'altra banda, el deteriorament d'ambdós durant l'envelliment està relacionat amb l'acumulació de conjugats proteics ubiquitinitzats en diferents teixits (Cuervo et al., 2005; Li et al., 2008; Ma et al., 2011; Rajawat et al., 2009). Aquest fet el vam poder confirmar tant a nivell cerebral (hipocamp i còrtex) com a nivell perifèric (múscul i fetge). De manera exclusiva en el còrtex cerebral, la realització d'exercici va revertir l'augment lligat a l'envelliment dels nivells de proteïnes ubiquitinitzades fins a valors semblants al grup d'animals joves.

Si recordem, el procés d'autofàgia (macroautofàgia) comprèn diferents etapes, des de la formació del fagòfor fins a la digestió final dels elements a eliminar pels lisosomes, en què intervenen diferents components (Klionsky et al., 2012; Mizushima i Komatsu, 2011; Pallauf i Rimbach, 2012; Rezzani et al., 2012; Tanida, 2011). Els nostres resultats mostren com l'exercici físic és capaç d'activar el procés d'autofàgia de manera selectiva a nivell de còrtex cerebral, on vam determinar els següents canvis:

D'una banda, els nivells d'mTOR fosforilat, -i per tant, la seva activació, inhibint així la formació del fagòfor-, eren superiors en el grup de rates adultes sedentàries. L'exercici (i també la manipulació dels animals), els va disminuir fins a valors semblants al grup de rates joves. Beclina 1 està implicada en la formació de l'autofagosoma i es coneix que, durant l'envelliment, els seus nivells disminueixen en el còrtex cerebral (Shibata et al., 2006). Aquest descens també el vam determinar en el grup d'animals adults sedentaris (SED), i on l'exercici (i també la manipulació) va ser capaç de revertir-lo. Se sap que Beclina 1 es troba regulada negativament per la seva unió a BCL-2, i quan són fosforilades (per exemple, en una situació de manca de nutrients o en una situació de l'estrès del RE), es perd la seva interacció, activant així l'autofàgia (Wei et al., 2008; Zalckvar et al., 2009). Així, vam voler determinar a nivell del còrtex cerebral si l'exercici podria activar el mecanisme d'autofàgia al modificar la interacció entre Beclina 1 i BCL-2. Els nostres resultats no van mostrar canvis en la interacció d'ambdues proteïnes entre els diferents grups experimentals quan es va realitzar la co-immunoprecipitació, ni tampoc van variar els nivells proteics de BCL-2. Així doncs, es va descartar aquesta activació del procés d'autofàgia independent d'mTOR a nivell del còrtex cerebral. Referent a LC3B-II, el qual està implicat en l'elongació i maduració de l'autofagosoma, se sap que l'augment dels seus nivells és indicador de l'activació de l'autofàgia. D'altra banda, quan LC3B s'analitza per tècniques d'immunohistoquímica, l'observació d'un major marcatge puntejat és indicador de la inducció de l'autofàgia. Cal dir que es recomanen ambós paràmetres quan s'estudia a LC3B (Klionsky et al., 2012). Així, els nostres resultats d'immunohistoquímica d'LC3B van mostrar un major marcatge puntejat en els animals que havien fet exercici (també en els animals manipulats), semblant al grup d'animals joves. Aquests resultats es correlacionen amb els obtinguts per western blot, on es van determinar uns nivells superiors d'LC3B-II en els grups EXE i NoEXE respecte al grup SED. Finalment, pel que fa a LAMP1, se sap que és una proteïna lisosomal implicada en la fusió de l'autofagosoma amb el lisosoma (Huynh et al., 2007). Els nostres resultats van mostrar un augment de LAMP1 en el grup de rates adultes, i dintre d'aquests, de manera més accentuada en el grup d'animals que havien fet exercici. Per tant, la inhibició d'mTOR amb l'exercici, juntament amb l'augment en els nivells de Beclina 1 i LAMP1, estarien contribuint a l'activació de l'autofàgia a nivell del còrtex cerebral, i conseqüentment, es disminuirien els nivells de proteïnes ubiquitinitzades.

La proteïna p62 és capaç d'interaccionar amb LC3B i d'incorporar el material ubiquitinitzat a l'interior de l'autofagosoma (Mizushima i Komatsu, 2011). Està descrit que la inhibició del procés d'autofàgia s'acompanya de l'acumulació de p62. Aquest fet condueix a un deteriorament del sistema d'eliminació UPS (Korolchuk et al., 2009), i conseqüentment, a la formació d'agregats que contenen p62 i ubiquitina, tant en neurones com en hepatòcits (Komatsu et al., 2007). Així, a nivell de l'hipocamp, els nivells de LAMP1 més baixos mesurats en els tres grups de rates adultes conjuntament amb l'increment de p62, estarien relacionats amb l'increment de proteïnes ubiquitinitzades en aquests grups d'animals.

A nivell perifèric, destacaria els resultats obtinguts en el fetge. Aquests mostren un increment dels nivells d'mTOR fosforilat en el grup de rates que havien fet exercici (i també en NoEXE) respecte el grup de rates adultes sedentàries, sent els nivells de fosforilació de la seva diana p70S6K més elevats sols en el grup d'animals EXE. D'altra banda, es va determinar de manera exclusiva un augment dels nivells de p62 en el grup de rates que havien fet exercici. L'augment d'mTOR fosforilat seria indicatiu de la inhibició de l'autofàgia, el que produiria l'acumulació de p62. Aquesta seqüència està ben establerta, però si ens centrem a nivell hepàtic, diferents autors apunten a que mTOR també regularia aspectes relacionats amb el metabolisme (Moscato i Diaz-Meco, 2011). Així, s'ha descrit que l'activació d'mTOR en fetge protegeix de l'esteatosi hepàtica induïda tant per l'edat com per una dieta rica en greixos (Yecies et al., 2011). A més, la deficiència de p62 produeix un augment dels depòsits de greix en fetge, i també a nivell general de l'organisme (Rodriguez et al., 2006). Així doncs, tant l'activació d'mTOR com l'augment de p62 a nivell hepàtic, podria tenir un efecte positiu en els animals que havien fet exercici reduint el contingut lipídic en aquest òrgan. LAMP1 va disminuir en els tres grups de rates adultes, fet que podria contribuir a l'increment dels nivells de proteïnes ubiquitinitzades observat en aquests animals.

A nivell muscular, malgrat no observar canvis pel que fa a l'activació d'mTOR entre els diferents grups experimentals, els nivells de proteïnes ubiquitinitzades i de p62 van augmentar en els tres grups de rates adultes. Aquest fet estaria relacionat amb el descens del procés autofàgic amb l'envelliment, i on l'exercici moderat de llarg termini no va ser capaç de reactivar-lo. L'augment de LAMP1 en el grup de rates entrenades no va ser suficient per activar l'autofàgia i reduir així els nivells de proteïnes ubiquitinitzades.

Finalment, a nivell cardíac no vam determinar canvis en els diferents elements estudiats del procés d'autofàgia, ja sigui per l'envelliment o degut a la pràctica d'exercici físic i la manipulació.

Estudis recents com el de He et al. (2012a, 2012b) mostren com una única sessió d'exercici és capaç d'activar l'autofàgia tant a nivell del còrtex cerebral com a nivell perifèric en el múscul esquelètic i cardíac, en el fetge, en el pàncrees i també en el teixit adipós; remarcant l'activació d'AMPK junt amb la dissociació entre BCL-2 i Beclina 1 com a mecanismes claus en l'activació de l'autofàgia. Els mateixos autors destaquen la relació entre el metabolisme i l'autofàgia, ja que l'administració d'una dieta rica en greixos a ratolins joves (8 setmanes) provocava una menor activació d'aquesta última a nivell muscular i cardíac. A més, l'autofàgia estaria implicada en els beneficis relacionats amb el metabolisme desencadenats per la pràctica d'exercici. Així, en ratolins que presentaven mutacions en BCL-2, -i que per tant no es podia dissociar de Beclina 1 i activar l'autofàgia-, es va determinar un deteriorament de la tolerància oral a la glucosa, on la realització d'exercici físic va ser capaç de millorar-la tan sols en els animals que no presentaven la mutació o *wild-type* (He et al., 2012a). D'altra banda, la pràctica d'exercici regular produeix una resposta adaptativa pel que fa a l'activació de l'autofàgia a nivell muscular. Així, l'augment del ràtio LC3B-II/LC3B-I, -com a mesura de la seva activació-, després d'una única sessió d'exercici, es perd amb l'entrenament (Grumati et al., 2011; Wohlgemuth et al., 2010), i fins i tot a les poques hores de la seva realització (Kim et al., 2012). Aquest efecte transitori, encara que beneficiós de l'exercici, explicaria que, tot i que el procés d'autofàgia no està plenament actiu en models d'exercici moderat de llarg termini com el nostre, part dels efectes beneficiosos i als quals hem fet menció durant aquesta discussió, podrien ser deguts a l'activació de l'autofàgia en les primeres setmanes de la intervenció a nivell perifèric.

Es coneix que l'activació d'AMPK pot induir l'autofàgia a través de SIRT1 o de la inhibició d'mTOR de manera indirecta (Pallauf i Rimbach, 2012). D'altra banda, se sap que l'acetilació protegeix a les proteïnes de la seva ubiquitinització i la posterior degradació (Li et al., 2010a, 2002), destacant així la funció de SIRT1 i altres desacetilases en la regulació de l'estat d'acetilació, i per tant de l'estabilitat dels seus substrats. A més, hi han estudis que també indiquen a IGF-1 com un activador del procés d'autofàgia,

estimulant el procés de fusió de l'autofagosoma amb el lisosoma (Bains et al., 2011, 2009). Si recordem, l'exercici a nivell cerebral va activar a AMPK i va produir un augment tant dels nivells proteics com de l'activitat de SIRT1 (Bayod et al., 2011). Aquests fets, juntament amb l'increment en els nivells d'IGF-1 en el sèrum de les rates que havien fet exercici, podria contribuir tot plegat a l'activació del mecanisme d'autofàgia i a la reducció dels nivells de proteïnes ubiquitinitzades a nivell del còrtex cerebral en aquests animals. D'altra banda, el fet d'observar tan sols una activació de l'autofàgia a nivell del còrtex cerebral, no descarta l'activació d'aquest procés en l'hipocamp. De manera que, tal i com hem comentat que succeeix a nivell muscular, la resposta inicial de l'exercici es podria veure atenuada amb el pas del temps, i potser per això nosaltres no vam determinar canvis a nivell de l'hipocamp amb el nostre protocol d'exercici de llarg termini.

Resumint, l'exercici físic moderat de llarg termini activa el procés d'autofàgia a nivell del còrtex cerebral, reduint l'acumulació de proteïnes ubiquitinitzades i possiblement, altres components, contribuint així al manteniment de l'homeòstasi i la supervivència neuronal (Figura 18). A nivell hepàtic, al modular alguns elements que regulen el mecanisme d'autofàgia, la pràctica d'exercici podria contribuir de manera positiva en la regulació d'aspectes relacionats amb el metabolisme.

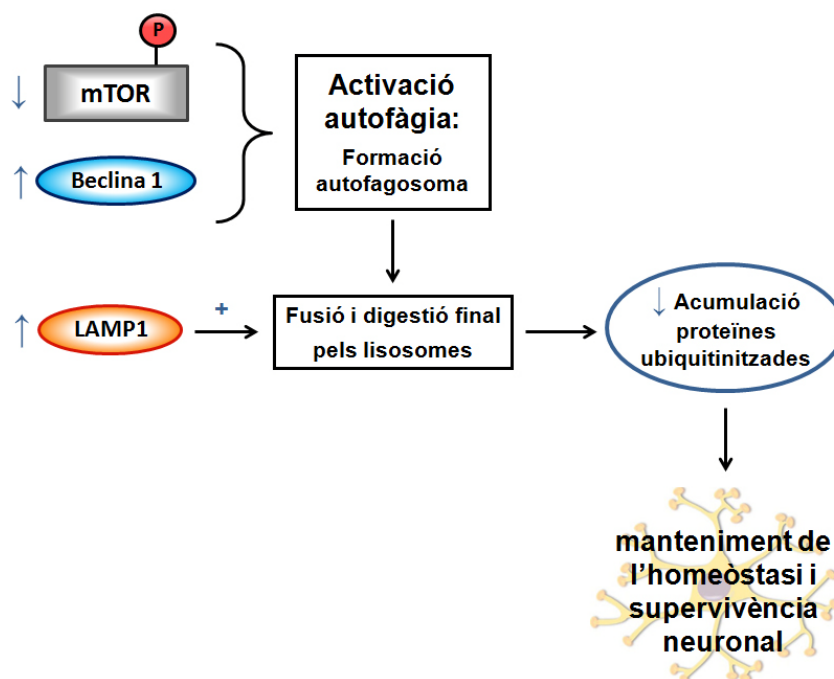


Figura 18. Esquema dels efectes de l'exercici físic a nivell cerebral (còrtex) sobre el mecanisme d'autofàgia.

5. Estudi de la via Wnt (via canònica) a nivell de l'hipocamp (Publicació 4)

La via canònica Wnt regula l'activació de diferents gens implicats en l'homeòstasi i la supervivència neuronal (Caraci et al., 2008). Així, hi ha autors que proposen la inactivació de la via Wnt com a responsable del deteriorament cognitiu en l'envelliment, ja que la seva activació estimula tant el procés de neurogènesi (Lie et al., 2005; Miranda et al., 2012; Okamoto et al., 2011) com el nombre de sinapsis i espines dendrítiques (Gogolla et al., 2009). Estudis recents en ratolins transgènics mostren com una inactivació d'aquesta via condueix a un augment de la mort neuronal per apoptosi (Kim et al., 2011).

Un dels antagonistes de la via més estudiat és la proteïna DKK-1. Aquest s'uneix al co-receptor LRP5/6, impedit així la seva interacció amb Wnt (Clevers i Nusse, 2012). Així, l'augment en els nivells de DKK-1 tant en malalts d'Alzheimer (Caricasole et al., 2004) com en diferents models transgènics de la malaltia (Rosi et al., 2010), apunten a aquest antagonista com un dels responsables del procés neurodegeneratiu que es produeix en la malaltia d'Alzheimer i en altres patologies del sistema nerviós central, com la isquèmia i l'epilèpsia (Caraci et al., 2008; Purro et al., 2012). En els nostres resultats d'immunohistoquímica, vam observar un menor marcatge de la proteïna DKK-1 en el gir dentat de l'hipocamp de les rates manipulades, i de manera més important en els animals que havien fet exercici. Els resultats per western blot van confirmar un descens dels nivells proteics de DKK-1. Es coneix que la via Wnt i la via de sirtuïna 1 estan relacionades entre si. Així, SIRT1 redueix l'expressió de DKK-1 (Hussain et al., 2009), mentre que p53 la induïx (Caricasole et al., 2004; Wang et al., 2000). Per tant, l'augment en els nivells i activitat de SIRT1 juntament amb el descens dels nivells de p53 acetilada, determinats tots ells en l'hipocamp dels grups EXE i NoEXE en el primer treball (Bayod et al., 2011), es correlacionaria amb el descens en els nivells proteics de DKK-1 observat en ambdós grups.

Quan vam estudiar diferents components implicats en la via de la Wnt, primer de tot vam avaluar la fosforilació, i per tant l'activació del receptor LRP6 (Zeng et al., 2005). L'estat de fosforilació d'LRP6 no va variar entre els diferents grups, però si ho van fer els nivells proteics totals d'aquest receptor, determinant-se uns valors més baixos en el grup de rates sedentàries.

Si recordem, quan la via Wnt no està activada, el ‘complex de destrucció’ format per Axina1, GSK-3 α/β , APC i CK1 α/δ , fosforila a β -catenina, produint-se posteriorment la seva ubiquitinització i degradació pel proteosoma (Clevers i Nusse, 2012). Pel que fa a Axina1, es van determinar uns nivells menors amb l’exercici i la manipulació. D’altra banda, l’activació de GSK-3 β ja s’havia avaluat prèviament (Bayod et al., 2011), on es van establir uns nivells més elevats de la forma fosforilada en el residu de tirosina 216 en el grup de rates sedentàries, i per tant, una major activació de GSK-3 β . Nosaltres vam voler estudiar també el seu homòleg, la cinasa GSK-3 α , per estar també implicada en la fosforilació de β -catenina (Doble et al., 2007). Al igual que GSK-3 β , es va determinar una major activació de GSK-3 α en el grup SED, sent més alts els nivells de la forma fosforilada (activa) en el residu de tirosina 279 (Joep et al., 2007). Per tant, l’augment en els nivells d’Axina1 juntament amb l’activació de GSK-3 α/β , facilitaria la fosforilació de β -catenina, i conseqüentment, la seva posterior ubiquitinització i degradació. Cas contrari al que esperàriem en el grup d’animals que havien fet exercici (i en els manipulats), on el descens d’Axina1 i la menor activació de GSK-3 α/β , suggereixen l’estabilització i per tant, major translocació de β -catenina al nucli, activant així l’expressió dels seus gens diana.

Per tant, el següent pas va ser mesurar els nivells de β -catenina fosforilada en diferents residus i els seus nivells totals. Es coneix que AKT i PKA fosforilen a β -catenina en el residu de serina 552, i a més a més, PKA ho fa en el residu de serina 675. Aquestes fosforilacions indueixen l’acumulació de β -catenina a nivell nuclear i la seva activitat transcripcional (Fang et al., 2007; Taurin et al., 2006). D’altra banda, GSK-3 fosforila a β -catenina en els residus de serina 33 i 37 i de treonina 41, el que condueix a la posterior ubiquitinització i degradació de β -catenina pel proteosoma (Liu et al., 2002). Malgrat observar una menor activació de GSK-3 α/β en el grup EXE i NoEXE, no es van determinar canvis ni pel que fa a β -catenina fosforilada en els residus de serina i treonina ni tampoc en els seus nivells totals. En models transgènics de la malaltia d’Alzheimer tampoc s’han descrit canvis en els nivells totals de β -catenina, però si ho van fer a nivell nuclear, els quals es trobaven reduïts (Rosi et al., 2010).

Les proteïnes de la família BCL-2, BAX (proapoptòtica) i BCL-2 (antiapoptòtica), són regulades per la via Wnt. Així, la mort cel·lular resultant al ser bloquejada la via per DKK-1, s’ha correlacionat amb l’augment dels nivells proteics de BAX junt amb el

descens de BCL-2 (Scali et al., 2006). A més, *Bcl-2* es considera un gen diana de β -catenina (Fuentesalba et al., 2004). Els nostres resultats no mostren canvis en els nivells proteics de BAX entre els diferents grups experimentals, però sí uns nivells més alts de BCL-2 en el grup de rates que havia fet exercici així com amb la manipulació. Així doncs, aquest fet podria contribuir de manera positiva a la supervivència neuronal en l'hipocamp d'aquests animals.

D'altra banda, està ben establert que *Axina2* és un gen diana de β -catenina, sent l'augment dels seus nivells (mRNA i proteics) un indicador de l'activació de la via. A més, es coneix que *Axina2* realitza un mecanisme de retroalimentació negatiu, regulant així la durada i/o la intensitat de l'activació de la via Wnt (Lustig et al., 2002). Tot i que els nostres resultats mostren una disminució dels nivells proteics d'*Axina2* en el grup de rates sedentàries respecte als grups de rates entrenades i manipulades, -fet que seria indicatiu d'una menor activació de la via-, aquest descens no va ser estadísticament significatiu.

Es coneix que la via Wnt està implicada en la regulació de la plasticitat sinàptica en l'hipocamp (Gogolla et al., 2009). Durant el nostre estudi, tal i com apunten altres autors (O'Callaghan et al., 2009), la manipulació que va rebre el grup de rates NoEXE junt amb la seva exposició en un ambient diferent al de la seva gàbia habitual, suggereixen que aquests animals van experimentar un enriquiment ambiental respecte al grup SED, els quals van romandre sempre a l'interior de la gàbia. Si recordem, en el primer treball exposat (Bayod et al., 2011), es va determinar una modulació de la plasticitat sinàptica, caracteritzada per un increment en els nivells de sinaptofisina, de manera exclusiva en l'hipocamp de les rates que havien fet exercici. Així, tot i que els nostres resultats indiquen una activació de la via Wnt en l'hipocamp, tant per l'exercici moderat de llarg termini com per la manipulació, aquesta última no seria suficient per incrementar la transmissió sinàptica en el nostre model. Cassilhas et al. (2012) tampoc van observar canvis en els nivells de sinaptofisina en l'hipocamp amb la manipulació dels animals, i sí amb l'exercici. Per tant, un altre tipus d'enriquiment ambiental, com pot ser la presència a l'interior de la gàbia de l'animal de joguines, tubs i cases de plàstic, entre d'altres, podria ser més adequat amb l'objectiu de modular els nivells de sinaptofisina i altres paràmetres relacionats amb la plasticitat sinàptica (Beauquis et al., 2010; Birch et al., 2013; Lambert et al., 2005).

Per últim, estudis recents estableixen que DKK-1 produeix una reducció en el nombre de sinàpsis en neurones hipocampals (Purro et al., 2012). A més, recentment s'ha determinat en l'hipocamp que tant l'expressió com els nivells proteics de DKK-1 augmenten en l'envelliment, reduint el procés de neurogènesi junt amb un deteriorament cognitiu (Seib et al., 2013). Aquest fet, junt amb l'increment dels seus nivells tant en el cervell de malalts d'Alzheimer (Caricasole et al. 2004) com en diferents models transgènics de la malaltia (Rosi et al., 2010), indiquen a DKK-1 com una possible diana terapèutica en el deteriorament cognitiu associat a l'envelliment i a la malaltia d'Alzheimer, sent la pràctica d'exercici capaç de reduir els seus nivells.

Com a conclusió final d'aquest apartat podem dir que, tant l'exercici com la manipulació dels animals redueixen els nivells de l'antagonista DKK-1. Conseqüentment, es produeix una activació de la via canònica Wnt en l'hipocamp de rates adultes, contribuint així al manteniment de l'homeòstasi i la supervivència neuronal (Figura 19). El fet que sol l'exercici i no la manipulació fos capaç d'incrementar els nivells de sinaptofisina, suggereix que l'exercici estaria modificant altres vies o processos amb l'objectiu de modular la plasticitat sinàptica.

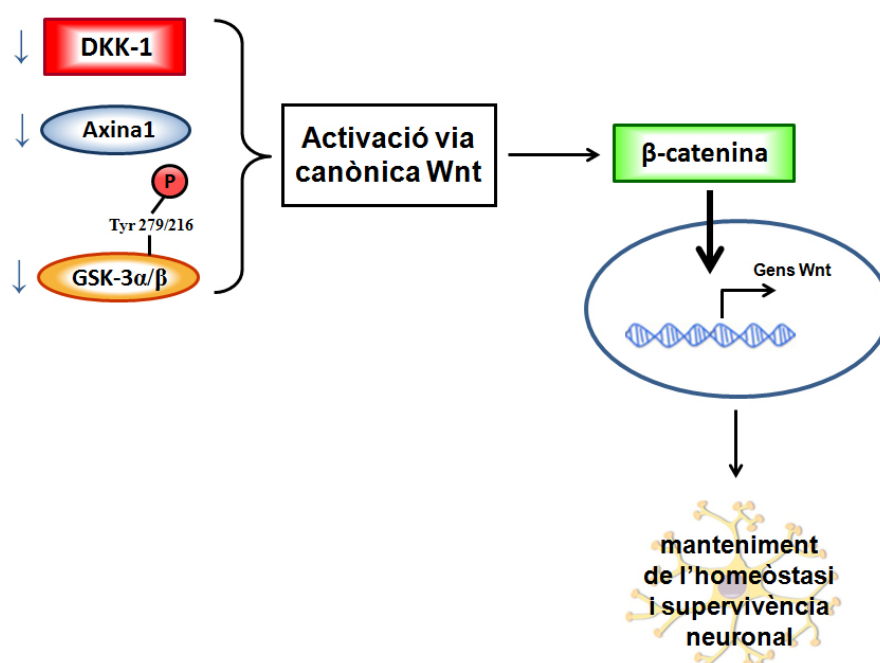


Figura 19. Esquema dels efectes de l'exercici físic sobre la via canònica Wnt en hipocamp.

6. Resum dels efectes de l'exercici físic a nivell cerebral i perifèric

Efectes a nivell cerebral

Si considerem els resultats obtinguts a nivell de l'hipocamp i el còrtex cerebral, observem com l'exercici físic moderat de llarga durada exerceix tot un conjunt d'efectes que resultarien positius a nivell cerebral. Així, l'activació de la via de sirtuïna 1 produiria una disminució dels processos apoptòtics en inhibir a p53. També SIRT1, juntament amb AMPK i PGC-1 α , estimularia la biogènesi mitocondrial. A més, tot i que no es van mesurar els nivells d'acetilació de tau, es coneix que SIRT1 la disminueix. Per tant, l'augment d'activitat de SIRT1, contribuiria al manteniment de la supervivència, la funcionalitat i l'estructura neuronal. A més, estudis recents apunten a SIRT1 com una important reguladora dels processos relacionats amb la plasticitat sinàptica junt amb la capacitat d'aprenentatge i memòria. D'altra banda, l'exercici físic al reduir l'activació de GSK-3 α/β juntament amb els nivells de tau fosforilada, a més d'augmentar els nivells de sinaptofisina, estaria contribuint al manteniment de la transmissió sinàptica. Quant al procés d'autofàgia, hem vist com l'exercici físic l'activa de manera específica a nivell del còrtex cerebral, participant així en el manteniment de l'homeòstasi i supervivència neuronal. A més, tant l'activació de SIRT1 com d'AMPK, estarien contribuint a l'activació de l'autofàgia. Finalment, pel que fa a la via Wnt, hem determinat una activació d'aquesta via amb l'exercici al produir, entre d'altres accions, una disminució de l'antagonista de la via DKK-1. Addicionalment als efectes beneficiosos sobre l'homeòstasi i supervivència neuronal, l'activació de Wnt podria contribuir en el manteniment de la transmissió sinàptica en l'hipocamp modulant els nivells de sinaptofisina. Arribat a aquest punt, caldria destacar la implicació de SIRT1 en l'activació tant del procés d'autofàgia com de la via Wnt. Així, amb els nostres resultats podem considerar a aquesta desacetilasa com un dels elements clau en la regulació de les diferents vies moleculars i processos estudiats en aquesta tesi doctoral, i que la pràctica d'exercici moderat de llarg termini és capaç de modular (Figura 20)

Efectes a nivell perifèric

Amb les dades obtingudes dels efectes de l'exercici físic a nivell perifèric (múscul esquelètic, fetge i cor), hem pogut comprovar resultats positius en tots aquests òrgans i teixits amb l'entrenament. En tots ells, es va determinar un augment dels nivells i activitat

de SIRT1 amb l'exercici, i conseqüentment, una disminució dels nivells de p53 acetilada. A més, en múscul es va determinar un augment de l'enzim NAMPT, fet que podria contribuir encara més a l'activació de SIRT1. Tot i que l'activitat d'AMPK no va variar amb l'exercici en cap teixit, si que ho van fer els nivells proteics de PGC-1 α . En canvi, es va determinar una estimulació de la biogènesi mitocondrial sol a nivell muscular. Pel que es refereix als resultats dels enzims antioxidants i el dany oxidatiu de proteïnes i lípids, cal destacar els efectes de l'exercici en múscul, augmentant els nivells proteics dels enzims SOD i CAT. Conseqüentment, l'augment del dany oxidatiu de proteïnes i lípids amb l'edat es va reduir a nivell muscular (també en fetge va disminuir l'oxidació de proteïnes amb l'exercici), contribuint així tot plegat a la millora funcional a nivell perifèric. Cal recordar que l'exercici físic també va incrementar els nivells de VEGF en fetge i cor, fet que podria estimular l'angiogènesi en aquests òrgans. I pel que fa al mecanisme d'autofàgia, sol es van observar alguns canvis destacats a nivell hepàtic, on l'augment amb l'exercici dels nivells d'mTOR fosforilat i p62, podria estar relacionat amb la disminució del contingut lipídic en aquest òrgan (Figura 21).

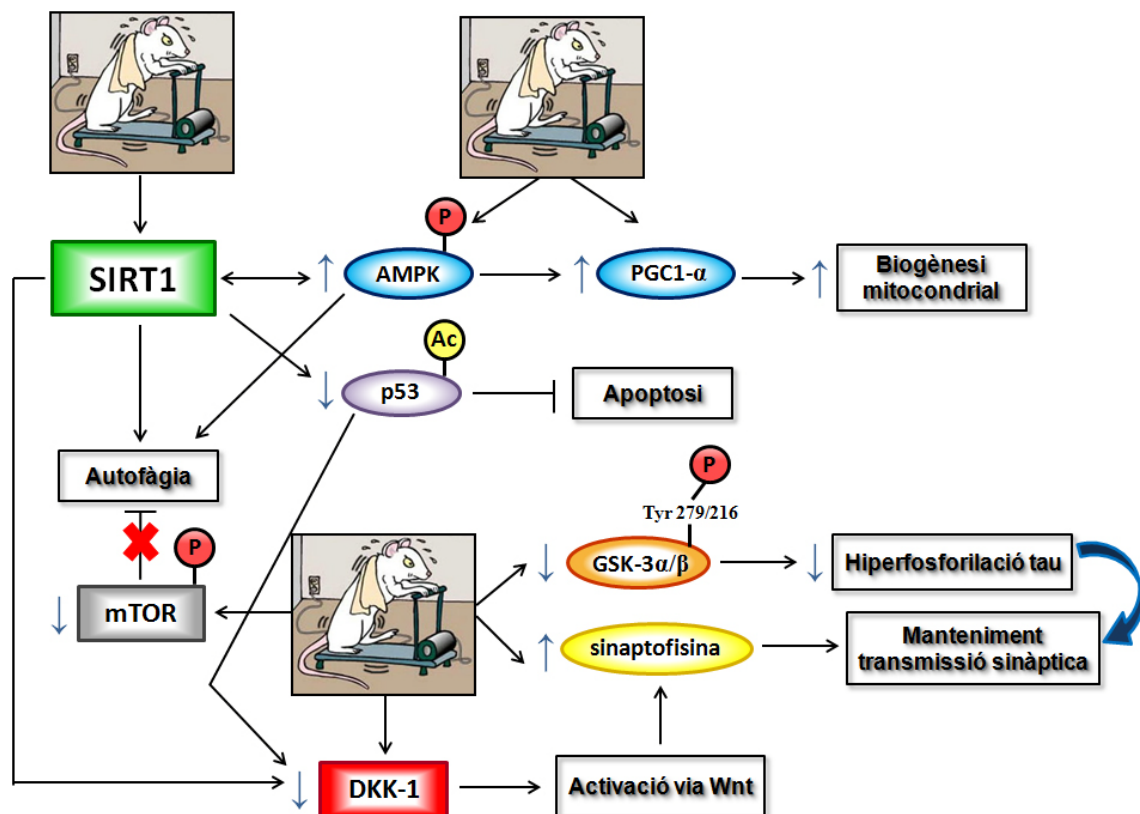


Figura 20. Esquema general dels efectes de l'exercici físic a nivell del còrtex i hipocamp
(Veure en els diferents apartats de la discussió els efectes específics de cada regió cerebral)

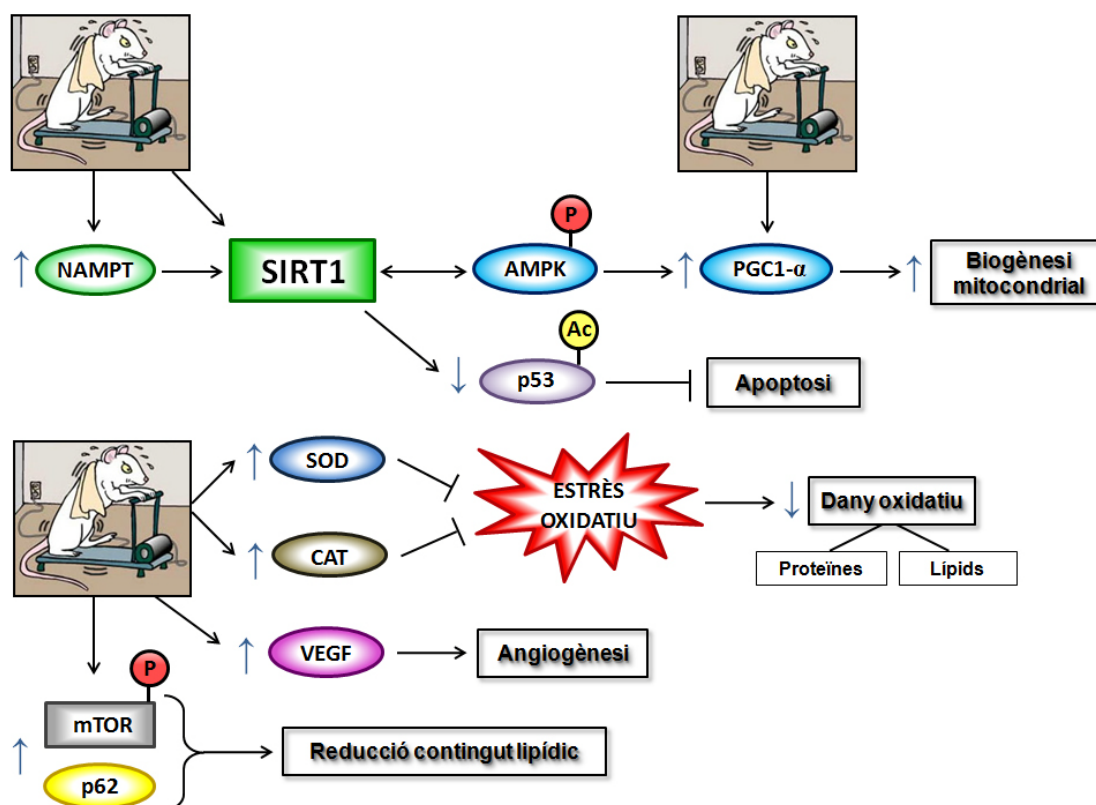


Figura 21. Esquema general dels efectes de l'exercici físic a nivell del múscul esquelètic, el fetge i el cor.

(Veure en els diferents apartats de la discussió els efectes específics de cada teixit i òrgan estudiat)

CONCLUSIONS

La conclusió general d'aquesta tesi doctoral és que, la realització d'exercici físic moderat de llarga durada des d'edats joves, produeix tot un conjunt d'efectes beneficiosos tant a nivell cerebral com a nivell perifèric. Així, a nivell cerebral destacar l'activació de la via de supervivència cel·lular de sirtuïna 1, l'estimulació de la biogènesi mitocondrial, la millora de diferents paràmetres relacionats amb la neurodegeneració i l'activació tant del procés d'autofàgia a nivell del còrtex cerebral com de la via Wnt en l'hipocamp. D'altra banda, a nivell perifèric, la pràctica d'exercici físic de llarg termini també activaria la via de SIRT1 en múscul, fetge i cor; però pel que fa a l'estimulació de la biogènesi mitocondrial, el descens del dany oxidatiu i l'augment dels nivells dels enzims antioxidants, aquests es produirien principalment a nivell muscular.

De manera més específica, les principals conclusions que se'n deriven d'aquesta tesi doctoral són les següents:

1. L'exercici físic moderat de llarga durada, i en menor grau la manipulació dels animals, produeixen una activació de la via de sirtuïna 1 a nivell cerebral (hipocamp i còrtex cerebral), la qual està disminuïda en l'envelliment. En canvi, solament l'exercici estimula la biogènesi mitocondrial en les dues àrees cerebrals estudiades.
2. La realització d'exercici físic millora el procés neurodegeneratiu associat a l'envelliment cerebral, ja que a nivell de l'hipocamp produeix una disminució de l'activació de GSK-3 β (també disminuïda per la manipulació) i dels nivells de tau fosforilada. D'altra banda, tant l'exercici com la manipulació augmenten els nivells de sinaptofisina en el còrtex, però només l'exercici és capaç d'incrementar-los en l'hipocamp.
3. L'exercici físic prevé la reducció deguda a l'edat del mecanisme d'autofàgia de manera selectiva a nivell del còrtex cerebral, disminuint així els nivells de proteïnes ubiquitinitzades.
4. La realització d'exercici físic i també la manipulació dels animals produeixen una activació de la via canònica Wnt en l'hipocamp.

5. La pràctica d'exercici regular també exerceix una activació de SIRT1 a nivell perifèric (múscul esquelètic, fetge i cor); en canvi, la biogènesi mitocondrial tan sols s'incrementa amb l'entrenament a nivell muscular. Els nivells de VEGF augmenten amb l'exercici en el fetge i en el cor.
6. L'exercici incrementa els nivells dels enzims antioxidants SOD i CAT a nivell muscular, juntament amb una disminució del dany oxidatiu proteic i lipídic (aquest últim també és disminuït per la manipulació). La realització d'exercici també redueix el dany oxidatiu proteic en el fetge.
7. Referent a l'autofàgia a nivell perifèric, l'exercici augmenta en fetge la fosforilació d'mTOR (també augmentada per la manipulació) i els nivells de p62. A nivell muscular, l'exercici incrementa els nivells de LAMP1.

Resumint, els nostres resultats han dilucidat algunes de les vies moleculars que resulten modificades amb l'exercici moderat de llarga durada a nivell cerebral i també a nivell perifèric, els quals han servit tant per confirmar resultats d'altres autors com per mostrar-ne altres d'innovadors, com és el cas de l'activació de la via Wnt a nivell de l'hipocamp amb l'exercici.

Així mateix, caldria fer referència a la inclusió del grup d'animals que malgrat no fer exercici, va estar sotmès a la manipulació per part de l'experimentador, considerant-se aquest un procés d'enriquiment ambiental. Vull ressaltar que, en la majoria de treballs publicats no es té en compte a aquest grup. Per tant, el fet d'incloure'l ha permès fer notar com alguns dels beneficis sobre les diferents vies moleculars estudiades no són exclusius de l'exercici, i que també poden produir-se com a conseqüència d'un procés d'enriquiment ambiental, malgrat això, en cap moment aquest supera l'efecte de l'exercici.

En conclusió, la pràctica d'exercici físic es consideraria una bona estratègia terapèutica preventiva del deteriorament cognitiu i fisiològic lligat a l'envelliment, el qual conduiria al desenvolupament de les malalties neurodegeneratives i metabòliques, ambdues molt presents actualment en la societat actual dels països desenvolupats.

BIBLIOGRAFIA

Adlard PA, Perreau VM, Pop V, Cotman CW. Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2005;25(17):4217-21.

Ahlskog JE, Geda YE, Graff-Radford NR, Petersen RC. Physical exercise as a preventive or disease-modifying treatment of dementia and brain aging. *Mayo Clin Proc.* 2011;86(9):876-84.

Aleman A, Torres-Alemán I. Circulating insulin-like growth factor I and cognitive function: neuromodulation throughout the lifespan. *Prog Neurobiol.* 2009;89(3):256-65.

Ambrose CT. Neuroangiogenesis: a vascular basis for Alzheimer's disease and cognitive decline during aging. *J Alzheimers Dis.* 2012;32(3):773-88.

Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(1):11-26.

Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med.* 2004;10 Suppl:S18-25.

Ang ET, Dawe GS, Wong PT, Moomhala S, Ng YK. Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. *Brain Res.* 2006;1113(1):186-93.

Ang ET, Gomez-Pinilla F. Potential therapeutic effects of exercise to the brain. *Curr Med Chem.* 2007;14(24):2564-71.

Angevaren M, Aufdemkampe G, Verhaar HJ, Aleman A, Vanhees L. Physical activity and enhanced fitness to improve cognitive function in older people without known cognitive impairment. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008;(2):CD005381.

Araki T, Sasaki Y, Milbrandt J. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science.* 2004;305(5686):1010-3

Avogaro A, de Kreutzenberg SV, Fadini GP. Insulin signaling and life span. *Pflugers Arch.* 2010;459(2):301-14.

Bains M, Florez-McClure ML, Heidenreich KA. Insulin-like growth factor-I prevents the accumulation of autophagic vesicles and cell death in Purkinje neurons by increasing the rate of autophagosome-to-lysosome fusion and degradation. *J Biol Chem.* 2009;284(30):20398-407.

- Bains M, Zaegel V, Mize-Berge J, Heidenreich KA. IGF-I stimulates Rab7-RILP interaction during neuronal autophagy. *Neurosci Lett*. 2011;488(2):112-7.
- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. 2006;444(7117):337-42.
- Bayod S, Del Valle J, Canudas AM, Lalanza JF, Sanchez-Roige S, Camins A, Escorihuela RM, Pallàs M. Long-term treadmill exercise induces neuroprotective molecular changes in rat brain. *J Appl Physiol*. 2011;111(5):1380-90.
- Beal MF. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol*. 2005;58(4):495-505.
- Beauquis J, Roig P, De Nicola AF, Saravia F. Short-term environmental enrichment enhances adult neurogenesis, vascular network and dendritic complexity in the hippocampus of type 1 diabetic mice. *PLoS One*. 2010;5(11):e13993.
- Belarbi K, Burnouf S, Fernandez-Gomez FJ, Laurent C, Lestavel S, Figeac M, Sultan A, Troquier L, Leboucher A, Caillierez R, Grosjean ME, Demeyer D, Obriot H, Brion I, Barbot B, Galas MC, Staels B, Humez S, Sergeant N, Schraen-Maschke S, Muhr-Tailleux A, Hamdane M, Buée L, Blum D. Beneficial effects of exercise in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease-like Tau pathology. *Neurobiol Dis*. 2011;43(2):486-94.
- Belinson H, Lev D, Masliah E, Michaelson DM. Activation of the amyloid cascade in apolipoprotein E4 transgenic mice induces lysosomal activation and neurodegeneration resulting in marked cognitive deficits. *J Neurosci*. 2008;28(18):4690-701.
- Belkacemi A, Ramassamy C. Time sequence of oxidative stress in the brain from transgenic mouse models of Alzheimer's disease related to the amyloid- β cascade. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(3):593-600.
- Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;239(1):70-6.

- Birch AM, McGarry NB, Kelly AM. Short-term environmental enrichment, in the absence of exercise, improves memory, and increases NGF concentration, early neuronal survival, and synaptogenesis in the dentate gyrus in a time-dependent manner. *Hippocampus*. 2013;23(6):437-50.
- Bishop NA, Lu T, Yankner BA. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*. 2010;464(7288):529-35.
- Blagosklonny MV. An anti-aging drug today: from senescence-promoting genes to anti-aging pill. *Drug Discov Today*. 2007;12(5-6):218-24.
- Boddapati S, Levites Y, Sierks MR. Inhibiting β -secretase activity in Alzheimer's disease cell models with single-chain antibodies specifically targeting APP. *J Mol Biol*. 2011;405(2):436-47.
- Boland B, Kumar A, Lee S, Platt FM, Wegiel J, Yu WH, Nixon RA. Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2008;28(27):6926-37.
- Boll MC, Alcaraz-Zubeldia M, Montes S, Rios C. Free copper, ferroxidase and SOD1 activities, lipid peroxidation and NO(x) content in the CSF. A different marker profile in four neurodegenerative diseases. *Neurochem Res*. 2008;33(9):1717-23.
- Bori Z, Zhao Z, Koltai E, Fatouros IG, Jamurtas AZ, Douroudos II, Terzis G, Chatzinikolaou A, Sovatzidis A, Draganidis D, Boldogh I, Radak Z. The effects of aging, physical training, and a single bout of exercise on mitochondrial protein expression in human skeletal muscle. *Exp Gerontol*. 2012;47(6):417-24.
- Boveris A, Navarro A. Brain mitochondrial dysfunction in aging. *IUBMB Life*. 2008a;60(5):308-14.
- Boveris A, Navarro A. Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. *Free Radic Biol Med*. 2008b;44(2):224-9.
- Breen DM, Sanli T, Giacca A, Tsiani E. Stimulation of muscle cell glucose uptake by resveratrol through sirtuins and AMPK. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;374(1):117-22.
- Brené S, Bjørnebekk A, Aberg E, Mathé AA, Olson L, Werme M. Running is rewarding and antidepressive. *Physiol Behav*. 2007;92(1-2):136-40.

Budanov AV, Karin M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell*. 2008;134(3):451-60.

Burnouf S, Martire A, Derisbourg M, Laurent C, Belarbi K, Leboucher A, Fernandez-Gomez FJ, Troquier L, Eddarkaoui S, Grosjean ME, Demeyer D, Muhr-Tailleux A, Buisson A, Sergeant N, Hamdane M, Humez S, Popoli P, Buée L, Blum D. NMDA receptor dysfunction contributes to impaired brain-derived neurotrophic factor-induced facilitation of hippocampal synaptic transmission in a Tau transgenic model. *Aging Cell*. 2013;12(1):11-23.

Caballero B, Coto-Montes A. An insight into the role of autophagy in cell responses in the aging and neurodegenerative brain. *Histol Histopathol*. 2012;27(3):263-75.

Cakatay U, Telci A, Kayali R, Tekeli F, Akçay T, Sivas A. Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle. *Clin Biochem*. 2003;36(1):51-5.

Calabrese EJ, Baldwin LA. Defining hormesis. *Hum Exp Toxicol*. 2002;21(2):91-7.

Cameron TP, Lattuada CP, Kornreich MR, Tarone RE. Longevity and reproductive comparisons for male ACI and Sprague-Dawley rat aging colonies. *Lab Anim Sci*. 1982;32(5):495-9.

Cantó C, Auwerx J. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol*. 2009;20(2):98-105.

Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*. 2009;458(7241):1056-60.

Caraci F, Busceti C, Biagioni F, Aronica E, Mastroiacovo F, Cappuccio I, Battaglia G, Bruno V, Caricasole A, Copani A, Nicoletti F. The Wnt antagonist, Dickkopf-1, as a target for the treatment of neurodegenerative disorders. *Neurochem Res*. 2008;33(12):2401-6.

Caricasole A, Copani A, Caraci F, Aronica E, Rozemuller AJ, Caruso A, Storto M, Gaviraghi G, Terstappen GC, Nicoletti F. Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's brain. *J Neurosci*. 2004;24(26):6021-7.

- Carro E, Nuñez A, Busiguina S, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J Neurosci*. 2000;20(8):2926-33.
- Cassilhas RC, Lee KS, Fernandes J, Oliveira MG, Tufik S, Meeusen R, de Mello MT. Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms. *Neuroscience*. 2012;202:309-17.
- Ciechanover A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(1):79-87.
- Clague MJ, Urbé S. Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell*. 2010;143(5):682-5.
- Clark PJ, Brzezinska WJ, Puchalski EK, Krone DA, Rhodes JS. Functional analysis of neurovascular adaptations to exercise in the dentate gyrus of young adult mice associated with cognitive gain. *Hippocampus*. 2009;19(10):937-50.
- Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*. 2012;149(6):1192-205.
- Coelho FG, Gobbi S, Andreatto CA, Corazza DI, Pedroso RV, Santos-Galduróz RF. Physical exercise modulates peripheral levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF): a systematic review of experimental studies in the elderly. *Arch Gerontol Geriatr*. 2013;56(1):10-5.
- Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R, Sinclair DA. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science*. 2004;305(5682):390-2.
- Cohen TJ, Guo JL, Hurtado DE, Kwong LK, Mills IP, Trojanowski JQ, Lee VM. The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation. *Nat Commun*. 2011;2:252.
- Costford SR, Bajpeyi S, Pasarica M, Albarado DC, Thomas SC, Xie H, Church TS, Jubrias SA, Conley KE, Smith SR. Skeletal muscle NAMPT is induced by exercise in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;298(1):E117-26.
- Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci*. 2007;30(9):464-72.

Crichton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, Gasco M, Garrone O, Crook T, Ryan KM. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell*. 2006;126(1):121-34.

Cuervo AM, Bergamini E, Brunk UT, Dröge W, Ffrench M, Terman A. Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. *Autophagy*. 2005;1(3):131-40.

Cui L, Jeong H, Borovecki F, Parkhurst CN, Tanese N, Krainc D. Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell*. 2006;127(1):59-69.

Chabi B, Adhihetty PJ, O'Leary MF, Menzies KJ, Hood DA. Relationship between Sirt1 expression and mitochondrial proteins during conditions of chronic muscle use and disuse. *J Appl Physiol*. 2009;107(6):1730-5.

Chae CH, Lee HC, Jung SL, Kim TW, Kim JH, Kim NJ, Kim HT. Swimming exercise increases the level of nerve growth factor and stimulates neurogenesis in adult rat hippocampus. *Neuroscience*. 2012;212:30-7.

Chen J, Zhou Y, Mueller-Steiner S, Chen LF, Kwon H, Yi S, Mucke L, Gan L. SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling. *J Biol Chem*. 2005;280(48):40364-74.

Cho JH, Johnson GV. Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding. *J Biol Chem*. 2003;278(1):187-93.

Chow VW, Mattson MP, Wong PC, Gleichmann M. An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular Med*. 2010;12(1):1-12.

Dasgupta B, Milbrandt J. Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(17):7217-22.

Dasuri K, Zhang L, Keller JN. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radic Biol Med*. 2012 Sep 19. doi:pii: S0891-5849(12)01141-0. [Epub ahead of print]

Dietrich MO, Antunes C, Geliang G, Liu ZW, Borok E, Nie Y, Xu AW, Souza DO, Gao Q, Diano S, Gao XB, Horvath TL. AgRP neurons mediate Sirt1's action on the melanocortin system and energy balance: roles for Sirt1 in neuronal firing and synaptic plasticity. *J Neurosci*. 2010;30(35):11815-25.

Ding Q, Vaynman S, Akhavan M, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Insulin-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise-induced cognitive function. *Neuroscience*. 2006a;140(3):823-33.

Ding YH, Li J, Zhou Y, Rafols JA, Clark JC, Ding Y. Cerebral angiogenesis and expression of angiogenic factors in aging rats after exercise. *Curr Neurovasc Res*. 2006b;3(1):15-23.

Dirks AJ, Leeuwenburgh C. Caloric restriction in humans: potential pitfalls and health concerns. *Mech Ageing Dev*. 2006;127(1):1-7.

Djavaheri-Mergny M, Amelotti M, Mathieu J, Besançon F, Bauvy C, Codogno P. Regulation of autophagy by NF-kappaB transcription factor and reactive oxygen species. *Autophagy*. 2007;3(4):390-2.

Djavaheri-Mergny M, Amelotti M, Mathieu J, Besançon F, Bauvy C, Souquère S, Pierron G, Codogno P. NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. *J Biol Chem*. 2006;281(41):30373-82.

Doble BW, Patel S, Wood GA, Kockeritz LK, Woodgett JR. Functional redundancy of GSK-3alpha and GSK-3beta in Wnt/beta-catenin signaling shown by using an allelic series of embryonic stem cell lines. *Dev Cell*. 2007;12(6):957-71.

Donmez G. The neurobiology of sirtuins and their role in neurodegeneration. *Trends Pharmacol Sci*. 2012;33(9):494-501.

Donmez G, Guarente L. Aging and disease: connections to sirtuins. *Aging Cell*. 2010;9(2):285-90.

Dröge W, Schipper HM. Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell*. 2007;6(3):361-70.

E L, Lu J, Burns JM, Swerdlow RH. Effect of exercise on mouse liver and brain bioenergetic infrastructures. *Exp Physiol*. 2013;98(1):207-19.

Eggermont LH, Swaab DF, Hol EM, Scherder EJ. Walking the line: a randomised trial on the effects of a short term walking programme on cognition in dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009;80(7):802-4.

Ernst C, Olson AK, Pinel JP, Lam RW, Christie BR. Antidepressant effects of exercise: evidence for an adult-neurogenesis hypothesis? *J Psychiatry Neurosci*. 2006;31(2):84-92.

Esiri MM. Ageing and the brain. *J Pathol*. 2007;211(2):181-7.

Fabel K, Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, Kuo CJ, Palmer TD. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 2003;18(10):2803-12.

Falone S, D'Alessandro A, Mirabilio A, Cacchio M, Di Ilio C, Di Loreto S, Amicarelli F. Late-Onset Running Biphasically Improves Redox Balance, Energy- and Methylglyoxal-Related Status, as well as SIRT1 Expression in Mouse Hippocampus. *PLoS One*. 2012;7(10):e48334.

Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, Nika H, Mills GB, Kobayashi R, Hunter T, Lu Z. Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem*. 2007;282(15):11221-9.

Farmer J, Zhao X, van Praag H, Wodtke K, Gage FH, Christie BR. Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. *Neuroscience*. 2004;124(1):71-9.

Federico A, Cardaioli E, Da Pozzo P, Formichi P, Gallus GN, Radi E. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *J Neurol Sci*. 2012;322(1-2):254-62.

Fernández-Fernández L, Comes G, Bolea I, Valente T, Ruiz J, Murtra P, Ramirez B, Anglés N, Reguant J, Morelló JR, Boada M, Hidalgo J, Escorihuela RM, Unzeta M. LMN diet, rich in polyphenols and polyunsaturated fatty acids, improves mouse cognitive decline associated with aging and Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*. 2012;228(2):261-71.

Ferrara N, Rinaldi B, Corbi G, Conti V, Stiuso P, Boccuti S, Rengo G, Rossi F, Filippelli A. Exercise training promotes SIRT1 activity in aged rats. *Rejuvenation Res*. 2008;11(1):139-50.

Floyd RA, Hensley K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging*. 2002;23(5):795-807.

Forlenza OV, de Paula VJ, Machado-Vieira R, Diniz BS, Gattaz WF. Does lithium prevent Alzheimer's disease? *Drugs Aging*. 2012;29(5):335-42.

Fuentealba RA, Farias G, Scheu J, Bronfman M, Marzolo MP, Inestrosa NC. Signal transduction during amyloid-beta-peptide neurotoxicity: role in Alzheimer disease. *Brain Res Brain Res Rev*. 2004;47(1-3):275-89.

Fukumoto S, Hsieh CM, Maemura K, Layne MD, Yet SF, Lee KH, Matsui T, Rosenzweig A, Taylor WG, Rubin JS, Perrella MA, Lee ME. Akt participation in the Wnt signaling pathway through Dishevelled. *J Biol Chem*. 2001;276(20):17479-83.

Gan L, Mucke L. Paths of convergence: sirtuins in aging and neurodegeneration. *Neuron*. 2008;58(1):10-4.

Gao J, Wang WY, Mao YW, Gräff J, Guan JS, Pan L, Mak G, Kim D, Su SC, Tsai LH. A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature*. 2010;466(7310):1105-9.

Garber CE, Blissmer B, Deschenes MR, Franklin BA, Lamonte MJ, Lee IM, Nieman DC, Swain DP; American College of Sports Medicine. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2011;43(7):1334-59.

García-Mesa Y, Giménez-Llort L, López LC, Venegas C, Cristòfol R, Escames G, Acuña-Castroviejo D, Sanfeliu C. Melatonin plus physical exercise are highly neuroprotective in the 3xTg-AD mouse. *Neurobiol Aging*. 2012;33(6):1124.e13-29.

García-Mesa Y, López-Ramos JC, Giménez-Llort L, Revilla S, Guerra R, Gruart A, Laferla FM, Cristòfol R, Delgado-García JM, Sanfeliu C. Physical exercise protects against Alzheimer's disease in 3xTg-AD mice. *J Alzheimers Dis*. 2011;24(3):421-54.

Garrido P. Aging and stress: past hypotheses, present approaches and perspectives. *Aging Dis*. 2011;2(1):80-99.

- Gavin TP, Ruster RS, Carrithers JA, Zwetsloot KA, Kraus RM, Evans CA, Knapp DJ, Drew JL, McCartney JS, Garry JP, Hickner RC. No difference in the skeletal muscle angiogenic response to aerobic exercise training between young and aged men. *J Physiol*. 2007;585(Pt 1):231-9.
- Ge S, Yang CH, Hsu KS, Ming GL, Song H. A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron*. 2007;54(4):559-66.
- Geda YE, Roberts RO, Knopman DS, Christianson TJ, Pankratz VS, Ivnik RJ, Boeve BF, Tangalos EG, Petersen RC, Rocca WA. Physical exercise, aging, and mild cognitive impairment: a population-based study. *Arch Neurol*. 2010;67(1):80-6.
- Geisler S, Holmström KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, Springer W. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol*. 2010;12(2):119-31.
- Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, Mostoslavsky R, Alt FW, Wu Z, Puigserver P. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. *EMBO J*. 2007;26(7):1913-23.
- Ghosh HS, McBurney M, Robbins PD. SIRT1 negatively regulates the mammalian target of rapamycin. *PLoS One*. 2010;5(2):e9199.
- Gogolla N, Galimberti I, Deguchi Y, Caroni P. Wnt signaling mediates experience-related regulation of synapse numbers and mossy fiber connectivities in the adult hippocampus. *Neuron*. 2009;62(4):510-25.
- Golbidi S, Laher I. Molecular mechanisms in exercise-induced cardioprotection. *Cardiol Res Pract*. 2011;2011:972807.
- Gomez-Pinilla F, Ying Z. Differential effects of exercise and dietary docosahexaenoic acid on molecular systems associated with control of allostasis in the hypothalamus and hippocampus. *Neuroscience*. 2010;168(1):130-7.
- Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem*. 2006;281(32):22429-33.
- Gorzalka BB, Hill MN. Putative role of endocannabinoid signaling in the etiology of depression and actions of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;35(7):1575-85.

Grealy MA, Johnson DA, Rushton SK. Improving cognitive function after brain injury: the use of exercise and virtual reality. *Arch Phys Med Rehabil.* 1999;80(6):661-7.

Gremeaux V, Gayda M, Lepers R, Sosner P, Juneau M, Nigam A. Exercise and longevity. *Maturitas.* 2012;73(4):312-7.

Griffin EW, Bechara RG, Birch AM, Kelly AM. Exercise enhances hippocampal-dependent learning in the rat: evidence for a BDNF related mechanism. *Hippocampus.* 2009;19(10):973-80.

Griffin ÉW, Mullally S, Foley C, Warmington SA, O'Mara SM, Kelly AM. Aerobic exercise improves hippocampal function and increases BDNF in the serum of young adult males. *Physiol Behav.* 2011;104(5):934-41.

Grumati P, Coletto L, Schiavinato A, Castagnaro S, Bertaggia E, Sandri M, Bonaldo P. Physical exercise stimulates autophagy in normal skeletal muscles but is detrimental for collagen VI-deficient muscles. *Autophagy.* 2011;7(12):1415-23.

Gündüz F, Sentürk UK, Kuru O, Aktekin B, Aktekin MR. The effect of one year's swimming exercise on oxidant stress and antioxidant capacity in aged rats. *Physiol Res.* 2004;53(2):171-6.

Guo Q, Wang Z, Li H, Wiese M, Zheng H. APP physiological and pathophysiological functions: insights from animal models. *Cell Res.* 2012;22(1):78-89.

Gustaw-Rothenberg K, Lerner A, Bonda DJ, Lee HG, Zhu X, Perry G, Smith MA. Biomarkers in Alzheimer's disease: past, present and future. *Biomark Med.* 2010;4(1):15-26.

Haase TN, Ringholm S, Leick L, Biensø RS, Kiilerich K, Johansen S, Nielsen MM, Wojtaszewski JF, Hidalgo J, Pedersen PA, Pilegaard H. Role of PGC-1 α in exercise and fasting-induced adaptations in mouse liver. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011;301(5):R1501-9.

Haigis MC, Guarente LP. Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev.* 2006;20(21):2913-21.

Hanger DP, Anderton BH, Noble W. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med.* 2009;15(3):112-9.

- Hanna J, Meides A, Zhang DP, Finley D. A ubiquitin stress response induces altered proteasome composition. *Cell*. 2007;129(4):747-59.
- Hansen AH, Nielsen JJ, Saltin B, Hellsten Y. Exercise training normalizes skeletal muscle vascular endothelial growth factor levels in patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 2010;28(6):1176-85.
- Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(10):774-85.
- Hariharan N, Maejima Y, Nakae J, Paik J, Depinho RA, Sadoshima J. Deacetylation of FoxO by Sirt1 Plays an Essential Role in Mediating Starvation-Induced Autophagy in Cardiac Myocytes. *Circ Res*. 2010;107(12):1470-82.
- Haskell WL, Lee IM, Pate RR, Powell KE, Blair SN, Franklin BA, Macera CA, Heath GW, Thompson PD, Bauman A. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med Sci Sports Exerc*. 2007;39(8):1423-34.
- He C, Bassik MC, Moresi V, Sun K, Wei Y, Zou Z, An Z, Loh J, Fisher J, Sun Q, Korsmeyer S, Packer M, May HI, Hill JA, Virgin HW, Gilpin C, Xiao G, Bassel-Duby R, Scherer PE, Levine B. Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature*. 2012a;481(7382):511-5.
- He C, Sumpter R Jr, Levine B. Exercise induces autophagy in peripheral tissues and in the brain. *Autophagy*. 2012b;8(10):1548-51.
- Heyman E, Gamelin FX, Goekint M, Piscitelli F, Roelands B, Leclair E, Di Marzo V, Meeusen R. Intense exercise increases circulating endocannabinoid and BDNF levels in humans--possible implications for reward and depression. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37(6):844-51.
- Hill LE, Droste SK, Nutt DJ, Linthorst AC, Reul JM. Voluntary exercise alters GABA(A) receptor subunit and glutamic acid decarboxylase-67 gene expression in the rat forebrain. *J Psychopharmacol*. 2010a;24(5):745-56.

- Hill MN, Titterness AK, Morrish AC, Carrier EJ, Lee TT, Gil-Mohapel J, Gorzalka BB, Hillard CJ, Christie BR. Endogenous cannabinoid signaling is required for voluntary exercise-induced enhancement of progenitor cell proliferation in the hippocampus. *Hippocampus*. 2010b;20(4):513-23.
- Holloway KR, Calhoun TN, Saxena M, Metoyer CF, Kandler EF, Rivera CA, Pruitt K. SIRT1 regulates Dishevelled proteins and promotes transient and constitutive Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(20):9216-21.
- Hoover BR, Reed MN, Su J, Penrod RD, Kotilinek LA, Grant MK, Pitstick R, Carlson GA, Lanier LM, Yuan LL, Ashe KH, Liao D. Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron*. 2010;68(6):1067-81.
- Hou X, Xu S, Maitland-Toolan KA, Sato K, Jiang B, Ido Y, Lan F, Walsh K, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Cohen RA, Zang M. SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 2008;283(29):20015-26.
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. 2003;425(6954):191-6.
- Hsu CP, Zhai P, Yamamoto T, Maejima Y, Matsushima S, Hariharan N, Shao D, Takagi H, Oka S, Sadoshima J. Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion. *Circulation*. 2010;122(21):2170-82.
- Huang SM, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, Charlat O, Wiellette E, Zhang Y, Wiessner S, Hild M, Shi X, Wilson CJ, Mickanin C, Myer V, Fazal A, Tomlinson R, Serluca F, Shao W, Cheng H, Shultz M, Rau C, Schirle M, Schlegl J, Ghidelli S, Fawell S, Lu C, Curtis D, Kirschner MW, Lengauer C, Finan PM, Tallarico JA, Bouwmeester T, Porter JA, Bauer A, Cong F. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature*. 2009;461(7264):614-20.
- Huffman DM, Moellering DR, Grizzle WE, Stockard CR, Johnson MS, Nagy TR. Effect of exercise and calorie restriction on biomarkers of aging in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;294(5):R1618-27.

Hung CW, Chen YC, Hsieh WL, Chiou SH, Kao CL. Ageing and neurodegenerative diseases. *Ageing Res Rev.* 2010;9 Suppl 1:S36-46.

Hussain M, Rao M, Humphries AE, Hong JA, Liu F, Yang M, Caragacianu D, Schrupp DS. Tobacco smoke induces polycomb-mediated repression of Dickkopf-1 in lung cancer cells. *Cancer Res.* 2009;69(8):3570-8.

Huynh KK, Eskelinen EL, Scott CC, Malevanets A, Saftig P, Grinstein S. LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *EMBO J.* 2007;26(2):313-24.

Iemitsu M, Maeda S, Jesmin S, Otsuki T, Miyauchi T. Exercise training improves aging-induced downregulation of VEGF angiogenic signaling cascade in hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(3):H1290-8.

Imai S, Guarente L. Ten years of NAD-dependent SIR2 family deacetylases: implications for metabolic diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2010;31(5):212-20.

Inestrosa NC, Montecinos-Oliva C, Fuenzalida M. Wnt signaling: role in Alzheimer disease and schizophrenia. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2012;7(4):788-807.

Inestrosa NC, Toledo EM. The role of Wnt signaling in neuronal dysfunction in Alzheimer's Disease. *Mol Neurodegener.* 2008;3:9.

Inoue K, Rispoli J, Kaphzan H, Klann E, Chen EI, Kim J, Komatsu M, Abeliovich A. Macroautophagy deficiency mediates age-dependent neurodegeneration through a phospho-tau pathway. *Mol Neurodegener.* 2012;7(1):48.

Irwin DJ, Cohen TJ, Grossman M, Arnold SE, Xie SX, Lee VM, Trojanowski JQ. Acetylated tau, a novel pathological signature in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Brain.* 2012;135(Pt 3):807-18.

Jamart C, Francaux M, Millet GY, Deldicque L, Frère D, Féasson L. Modulation of autophagy and ubiquitin-proteasome pathways during ultra-endurance running. *J Appl Physiol.* 2012;112(9):1529-37.

Janda CY, Waghray D, Levin AM, Thomas C, Garcia KC. Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science.* 2012;337(6090):59-64.

Ji LL. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(2):142-52.

Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*. 2011;7(3):279-96.

Johnson NA, Keating SE, George J. Exercise and the liver: implications for therapy in fatty liver disorders. *Semin Liver Dis*. 2012;32(1):65-79.

Johnson NA, Sachinwalla T, Walton DW, Smith K, Armstrong A, Thompson MW, George J. Aerobic exercise training reduces hepatic and visceral lipids in obese individuals without weight loss. *Hepatology*. 2009;50(4):1105-12.

Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem Res*. 2007;32(4-5):577-95.

Julien C, Tremblay C, Emond V, Lebbadi M, Salem N Jr, Bennett DA, Calon F. Sirtuin 1 reduction parallels the accumulation of tau in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009;68(1):48-58.

Jurgens HA, Johnson RW. Dysregulated neuronal-microglial cross-talk during aging, stress and inflammation. *Exp Neurol*. 2012;233(1):40-8.

Katalinic V, Modun D, Music I, Boban M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2005;140(1):47-52.

Kawanishi N, Yano H, Mizokami T, Takahashi M, Oyanagi E, Suzuki K. Exercise training attenuates hepatic inflammation, fibrosis and macrophage infiltration during diet induced-obesity in mice. *Brain Behav Immun*. 2012;26(6):931-41.

Ke HC, Huang HJ, Liang KC, Hsieh-Li HM. Selective improvement of cognitive function in adult and aged APP/PS1 transgenic mice by continuous non-shock treadmill exercise. *Brain Res*. 2011;1403:1-11.

Kemoun G, Thibaud M, Roumagne N, Carette P, Albinet C, Toussaint L, Paccalin M, Dugué B. Effects of a physical training programme on cognitive function and walking efficiency in elderly persons with dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2010;29(2):109-14.

- Khamzina L, Veilleux A, Bergeron S, Marette A. Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology*. 2005;146(3):1473-81.
- Kim YA, Kim YS, Song W. Autophagic response to a single bout of moderate exercise in murine skeletal muscle. *J Physiol Biochem*. 2012;68(2):229-35.
- Kim D, Nguyen MD, Dobbin MM, Fischer A, Sananbenesi F, Rodgers JT, Delalle I, Baur JA, Sui G, Armour SM, Puigserver P, Sinclair DA, Tsai LH. SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J*. 2007;26(13):3169-79.
- Kim H, Won S, Hwang DY, Lee JS, Kim M, Kim R, Kim W, Cha B, Kim T, Kim D, Costantini F, Jho EH. Downregulation of Wnt/ β -catenin signaling causes degeneration of hippocampal neurons in vivo. *Neurobiol Aging*. 2011;32(12):2316.e1-15.
- Klaus F, Amrein I. Running in laboratory and wild rodents: differences in context sensitivity and plasticity of hippocampal neurogenesis. *Behav Brain Res*. 2012;227(2):363-70.
- Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2012;8(4):445-544.
- Klionsky DJ, Meijer AJ, Codogno P. Autophagy and p70S6 kinase. *Autophagy*. 2005;1(1):59-61
- Knobloch M, Mansuy IM. Dendritic spine loss and synaptic alterations in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 2008;37(1):73-82.
- Koga H, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy dysfunction in the pathogenesis of neurodegeneration. *Neurobiol Dis*. 2011;43(1):29-37.
- Koltai E, Zhao Z, Lacza Z, Cselenyak A, Vacz G, Nyakas C, Boldogh I, Ichinoseki-Sekine N, Radak Z. Combined exercise and insulin-like growth factor-1 supplementation induces neurogenesis in old rats, but do not attenuate age-associated DNA damage. *Rejuvenation Res*. 2011;14(6):585-96.

Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*. 2007;131(6):1149-63.

Korolchuk VI, Mansilla A, Menzies FM, Rubinsztein DC. Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. *Mol Cell*. 2009;33(4):517-27.

Korolchuk VI, Menzies FM, Rubinsztein DC. Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Lett*. 2010;584(7):1393-8.

Kronenberg G, Bick-Sander A, Bunk E, Wolf C, Ehninger D, Kempermann G. Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. *Neurobiol Aging*. 2006;27(10):1505-13.

Kruse JP, Gu W. MSL2 promotes Mdm2-independent cytoplasmic localization of p53. *J Biol Chem*. 2009;284(5):3250-63.

Kumar A, Rani A, Tchigranova O, Lee WH, Foster TC. Influence of late-life exposure to environmental enrichment or exercise on hippocampal function and CA1 senescent physiology. *Neurobiol Aging*. 2012;33(4):828.e1-17.

Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*. 2006;127(6):1109-22.

Lalanza JF, Sanchez-Roige S, Gagliano H, Fuentes S, Bayod S, Camins A, Pallàs M, Armario A, Escorihuela RM. Physiological and behavioural consequences of long-term moderate treadmill exercise. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37(11):1745-54.

Lambert TJ, Fernandez SM, Frick KM. Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. *Neurobiol Learn Mem*. 2005;83(3):206-16.

- Lambertucci RH, Levada-Pires AC, Rossoni LV, Curi R, Pithon-Curi TC. Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and mRNA levels in soleus muscle from young and aged rats. *Mech Ageing Dev.* 2007;128(3):267-75.
- Laplane M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 2012;149(2):274-93.
- Laufs U, Urhausen A, Werner N, Scharhag J, Heitz A, Kissner G, Böhm M, Kindermann W, Nickenig G. Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2005;12(4):407-14.
- Lazarov O, Mattson MP, Peterson DA, Pimplikar SW, van Praag H. When neurogenesis encounters aging and disease. *Trends Neurosci.* 2010;33(12):569-79.
- Leasure JL, Jones M. Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. *Neuroscience.* 2008;156(3):456-65.
- Lee HC, Wei YH. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med (Maywood).* 2007;232(5):592-606.
- Lee IH, Cao L, Mostoslavsky R, Lombard DB, Liu J, Bruns NE, Tsokos M, Alt FW, Finkel T. A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(9):3374-9.
- Lee JH, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, Wolfe DM, Martinez-Vicente M, Massey AC, Sovak G, Uchiyama Y, Westaway D, Cuervo AM, Nixon RA. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell.* 2010;141(7):1146-58.
- Leem YH, Lim HJ, Shim SB, Cho JY, Kim BS, Han PL. Repression of tau hyperphosphorylation by chronic endurance exercise in aged transgenic mouse model of tauopathies. *J Neurosci Res.* 2009;87(11):2561-70.
- Leick L, Hellsten Y, Fentz J, Lyngby SS, Wojtaszewski JF, Hidalgo J, Pilegaard H. PGC-1alpha mediates exercise-induced skeletal muscle VEGF expression in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;297(1):E92-103.
- Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008;132(1):27-42.

- Li F, Chong ZZ, Maiese K. Vital elements of the Wnt-Frizzled signaling pathway in the nervous system. *Curr Neurovasc Res*. 2005;2(4):331-40.
- Li F, Zhang L, Craddock J, Bruce-Keller AJ, Dasuri K, Nguyen A, Keller JN. Aging and dietary restriction effects on ubiquitination, sumoylation, and the proteasome in the heart. *Mech Ageing Dev*. 2008;129(9):515-21.
- Li K, Wang R, Lozada E, Fan W, Orren DK, Luo J. Acetylation of WRN protein regulates its stability by inhibiting ubiquitination. *PLoS One*. 2010;5(4):e10341.
- Li L, Mühlfeld C, Niemann B, Pan R, Li R, Hilfiker-Kleiner D, Chen Y, Rohrbach S. Mitochondrial biogenesis and PGC-1 α deacetylation by chronic treadmill exercise: differential response in cardiac and skeletal muscle. *Basic Res Cardiol*. 2011;106(6):1221-34.
- Li M, Luo J, Brooks CL, Gu W. Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J Biol Chem*. 2002;277(52):50607-11.
- Li VS, Ng SS, Boersema PJ, Low TY, Karthaus WR, Gerlach JP, Mohammed S, Heck AJ, Maurice MM, Mahmoudi T, Clevers H. Wnt signaling through inhibition of β -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell*. 2012;149(6):1245-56.
- Li X, Zhang S, Blander G, Tse JG, Krieger M, Guarente L. SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol Cell*. 2007;28(1):91-106.
- Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Désiré L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR, Gage FH. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*. 2005;437(7063):1370-5.
- Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2006;443(7113):787-95.
- Lista I, Sorrentino G. Biological mechanisms of physical activity in preventing cognitive decline. *Cell Mol Neurobiol*. 2010;30(4):493-503.
- Little JP, Safdar A, Wilkin GP, Tarnopolsky MA, Gibala MJ. A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms. *J Physiol*. 2010;588(Pt 6):1011-22.

Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*. 2002;108(6):837-47.

Liu CY, Lee CF, Wei YH. Role of reactive oxygen species-elicited apoptosis in the pathophysiology of mitochondrial and neurodegenerative diseases associated with mitochondrial DNA mutations. *J Formos Med Assoc*. 2009a;108(8):599-611.

Liu HY, Han J, Cao SY, Hong T, Zhuo D, Shi J, Liu Z, Cao W. Hepatic autophagy is suppressed in the presence of insulin resistance and hyperinsulinemia: inhibition of FoxO1-dependent expression of key autophagy genes by insulin. *J Biol Chem*. 2009b;284(45):31484-92.

Liu YF, Chen HI, Wu CL, Kuo YM, Yu L, Huang AM, Wu FS, Chuang JI, Jen CJ. Differential effects of treadmill running and wheel running on spatial or aversive learning and memory: roles of amygdalar brain-derived neurotrophic factor and synaptotagmin I. *J Physiol*. 2009c;587(Pt 13):3221-31.

Lopez-Lopez C, LeRoith D, Torres-Aleman I. Insulin-like growth factor I is required for vessel remodeling in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(26):9833-8.

Lovell MA, Xiong S, Xie C, Davies P, Markesbery WR. Induction of hyperphosphorylated tau in primary rat cortical neuron cultures mediated by oxidative stress and glycogen synthase kinase-3. *J Alzheimers Dis*. 2004;6(6):659-71.

Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, van de Wetering M, Clevers H, Schlag PM, Birchmeier W, Behrens J. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol*. 2002;22(4):1184-93.

Llorens-Martín M, Torres-Alemán I, Trejo JL. Exercise modulates insulin-like growth factor 1-dependent and -independent effects on adult hippocampal neurogenesis and behaviour. *Mol Cell Neurosci*. 2010;44(2):109-17.

Ma Q, Qiang J, Gu P, Wang Y, Geng Y, Wang M. Age-related autophagy alterations in the brain of senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice. *Exp Gerontol*. 2011;46(7):533-41.

- Maiese K, Li F, Chong ZZ, Shang YC. The Wnt signaling pathway: aging gracefully as a protectionist? *Pharmacol Ther.* 2008;118(1):58-81.
- Malek MH, Olfert IM, Esposito F. Detraining losses of skeletal muscle capillarization are associated with vascular endothelial growth factor protein expression in rats. *Exp Physiol.* 2010;95(2):359-68.
- Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S, Sandri M. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab.* 2007;6(6):458-71.
- Manczak M, Anekonda TS, Henson E, Park BS, Quinn J, Reddy PH. Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet.* 2006;15(9):1437-49.
- Mangialasche F, Polidori MC, Monastero R, Ercolani S, Camarda C, Cecchetti R, Mecocci P. Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Ageing Res Rev.* 2009;8(4):285-305.
- Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH 3rd, Flynn C, Yuan H, Takada S, Kimelman D, Li L, Wu D. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell.* 2001;7(4):801-9.
- Marchi S, Giorgi C, Suski JM, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Missiroli S, Patergnani S, Poletti F, Rimessi A, Duszynski J, Wieckowski MR, Pinton P. Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging. *J Signal Transduct.* 2012;2012:329635.
- Marlatt MW, Lucassen PJ, van Praag H. Comparison of neurogenic effects of fluoxetine, duloxetine and running in mice. *Brain Res.* 2010;1341:93-9.
- Marlatt MW, Potter MC, Lucassen PJ, van Praag H. Running throughout middle-age improves memory function, hippocampal neurogenesis, and BDNF levels in female C57BL/6J mice. *Dev Neurobiol.* 2012;72(6):943-52.
- Marosi K, Bori Z, Hart N, Sárga L, Koltai E, Radák Z, Nyakas C. Long-term exercise treatment reduces oxidative stress in the hippocampus of aging rats. *Neuroscience.* 2012;226C:21-28.

- Martinez-Vicente M, Talloczy Z, Wong E, Tang G, Koga H, Kaushik S, de Vries R, Arias E, Harris S, Sulzer D, Cuervo AM. Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat Neurosci.* 2010;13(5):567-76.
- Matheu A, Maraver A, Klatt P, Flores I, Garcia-Cao I, Borrás C, Flores JM, Viña J, Blasco MA, Serrano M. Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway. *Nature.* 2007;448(7151):375-9.
- Matheu A, Maraver A, Serrano M. The Arf/p53 pathway in cancer and aging. *Cancer Res.* 2008;68(15):6031-4.
- Mecocci P, Fanó G, Fulle S, MacGarvey U, Shinobu L, Polidori MC, Cherubini A, Vecchiet J, Senin U, Beal MF. Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(3-4):303-8.
- Melov S, Adlard PA, Morten K, Johnson F, Golden TR, Hinerfeld D, Schilling B, Mavros C, Masters CL, Volitakis I, Li QX, Laughton K, Hubbard A, Cherny RA, Gibson B, Bush AI. Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau. *PLoS One.* 2007;2(6):e536.
- Mercken EM, Carboneau BA, Krzysik-Walker SM, de Cabo R. Of mice and men: the benefits of caloric restriction, exercise, and mimetics. *Ageing Res Rev.* 2012;11(3):390-8.
- Michán S, Li Y, Chou MM, Parrella E, Ge H, Long JM, Allard JS, Lewis K, Miller M, Xu W, Mervis RF, Chen J, Guerin KI, Smith LE, McBurney MW, Sinclair DA, Baudry M, de Cabo R, Longo VD. SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity. *J Neurosci.* 2010;30(29):9695-707.
- Middleton LE, Barnes DE, Lui LY, Yaffe K. Physical activity over the life course and its association with cognitive performance and impairment in old age. *J Am Geriatr Soc.* 2010;58(7):1322-6.
- Middleton LE, Mitnitski A, Fallah N, Kirkland SA, Rockwood K. Changes in cognition and mortality in relation to exercise in late life: a population based study. *PLoS One.* 2008;3(9):e3124.
- Min SW, Cho SH, Zhou Y, Schroeder S, Haroutunian V, Seeley WW, Huang EJ, Shen Y, Masliah E, Mukherjee C, Meyers D, Cole PA, Ott M, Gan L. Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. *Neuron.* 2010;67(6):953-66.

- Miranda CJ, Braun L, Jiang Y, Hester ME, Zhang L, Riolo M, Wang H, Rao M, Altura RA, Kaspar BK. Aging brain microenvironment decreases hippocampal neurogenesis through Wnt-mediated survivin signaling. *Aging Cell*. 2012;11(3):542-52.
- Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011;147(4):728-41.
- Molteni R, Ying Z, Gómez-Pinilla F. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. *Eur J Neurosci*. 2002;16(6):1107-16.
- Mora F, Segovia G, del Arco A. Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Res Rev*. 2007;55(1):78-88.
- Morselli E, Maiuri MC, Markaki M, Megalou E, Pasparaki A, Palikaras K, Ciriollo A, Galluzzi L, Malik SA, Vitale I, Michaud M, Madeo F, Tavernarakis N, Kroemer G. Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy. *Cell Death Dis*. 2010;1:e10.
- Moscat J, Diaz-Meco MT. Feedback on fat: p62-mTORC1-autophagy connections. *Cell*. 2011;147(4):724-7.
- Mustroph ML, Chen S, Desai SC, Cay EB, DeYoung EK, Rhodes JS. Aerobic exercise is the critical variable in an enriched environment that increases hippocampal neurogenesis and water maze learning in male C57BL/6J mice. *Neuroscience*. 2012;219:62-71.
- Nadtochiy SM, Yao H, McBurney MW, Gu W, Guarente L, Rahman I, Brookes PS. SIRT1-mediated acute cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(4):H1506-12.
- Nakahata Y, Sahar S, Astarita G, Kaluzova M, Sassone-Corsi P. Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science*. 2009;324(5927):654-7.
- Navarro A, Boveris A. Brain mitochondrial dysfunction in aging: conditions that improve survival, neurological performance and mitochondrial function. *Front Biosci*. 2007;12:1154-63.

- Navarro A, Gomez C, López-Cepero JM, Boveris A. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;286(3):R505-11.
- Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, Castellani RJ, Crain BJ, Davies P, Del Tredici K, Duyckaerts C, Frosch MP, Haroutunian V, Hof PR, Hulette CM, Hyman BT, Iwatsubo T, Jellinger KA, Jicha GA, Kövari E, Kukull WA, Leverenz JB, Love S, Mackenzie IR, Mann DM, Masliah E, McKee AC, Montine TJ, Morris JC, Schneider JA, Sonnen JA, Thal DR, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Wisniewski T, Woltjer RL, Beach TG. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012;71(5):362-81.
- Nemati Karimooy H, Hosseini M, Nemati M, Esmaily HO. Lifelong physical activity affects mini mental state exam scores in individuals over 55 years of age. *J Bodyw Mov Ther*. 2012;16(2):230-5.
- Nemoto S, Fergusson MM, Finkel T. SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1 α . *J Biol Chem*. 2005;280(16):16456-60.
- Nithianantharajah J, Hannan AJ. The neurobiology of brain and cognitive reserve: mental and physical activity as modulators of brain disorders. *Prog Neurobiol*. 2009;89(4):369-82.
- Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005;64(2):113-22.
- Nixon RA, Yang DS, Lee JH. Neurodegenerative lysosomal disorders: a continuum from development to late age. *Autophagy*. 2008;4(5):590-9.
- Nogueiras R, Habegger KM, Chaudhary N, Finan B, Banks AS, Dietrich MO, Horvath TL, Sinclair DA, Pfluger PT, Tschöp MH. Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. *Physiol Rev*. 2012;92(3):1479-514.
- Nunomura A, Castellani RJ, Zhu X, Moreira PI, Perry G, Smith MA. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006;65(7):631-41.

O'Callaghan RM, Griffin EW, Kelly AM. Long-term treadmill exposure protects against age-related neurodegenerative change in the rat hippocampus. *Hippocampus*. 2009;19(10):1019-29.

O'Callaghan RM, Ohle R, Kelly AM. The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. *Behav Brain Res*. 2007;176(2):362-6.

Okamoto M, Inoue K, Iwamura H, Terashima K, Soya H, Asashima M, Kuwabara T. Reduction in paracrine Wnt3 factors during aging causes impaired adult neurogenesis. *FASEB J*. 2011;25(10):3570-82.

Olesen J, Kiilerich K, Pilegaard H. PGC-1alpha-mediated adaptations in skeletal muscle. *Pflugers Arch*. 2010;460(1):153-62.

Olfert IM, Howlett RA, Tang K, Dalton ND, Gu Y, Peterson KL, Wagner PD, Breen EC. Muscle-specific VEGF deficiency greatly reduces exercise endurance in mice. *J Physiol*. 2009;587(Pt 8):1755-67.

Orallo F. Trans-resveratrol: a magical elixir of eternal youth? *Curr Med Chem*. 2008;15(19):1887-98.

Pallàs M, Pizarro JG, Gutierrez-Cuesta J, Crespo-Biel N, Alvira D, Tajés M, Yeste-Velasco M, Folch J, Canudas AM, Sureda FX, Ferrer I, Camins A. Modulation of SIRT1 expression in different neurodegenerative models and human pathologies. *Neuroscience*. 2008a;154(4):1388-97.

Pallàs M, Verdaguer E, Tajés M, Gutierrez-Cuesta J, Camins A. Modulation of sirtuins: new targets for antiageing. *Recent Pat CNS Drug Discov*. 2008b;3(1):61-9.

Pallauf K, Rimbach G. Autophagy, polyphenols and healthy ageing. *Ageing Res Rev*. 2012;12(1):237-252.

Parachikova A, Nichol KE, Cotman CW. Short-term exercise in aged Tg2576 mice alters neuroinflammation and improves cognition. *Neurobiol Dis*. 2008;30(1):121-9.

Pasini E, Le Douairon Lahaye S, Flati V, Assanelli D, Corsetti G, Specia S, Bernabei R, Calvani R, Marzetti E. Effects of treadmill exercise and training frequency on anabolic signaling pathways in the skeletal muscle of aged rats. *Exp Gerontol*. 2012;47(1):23-8.

Pereira AC, Huddleston DE, Brickman AM, Sosunov AA, Hen R, McKhann GM, Sloan R, Gage FH, Brown TR, Small SA. An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(13):5638-43.

Peterson MD, Gordon PM. Resistance exercise for the aging adult: clinical implications and prescription guidelines. *Am J Med*. 2011;124(3):194-8.

Pfister JA, Ma C, Morrison BE, D'Mello SR. Opposing effects of sirtuins on neuronal survival: SIRT1-mediated neuroprotection is independent of its deacetylase activity. *PLoS One*. 2008;3(12):e4090.

Pickford F, Masliah E, Britschgi M, Lucin K, Narasimhan R, Jaeger PA, Small S, Spencer B, Rockenstein E, Levine B, Wyss-Coray T. The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J Clin Invest*. 2008;118(6):2190-9.

Pinho RA, Andrades ME, Oliveira MR, Pirola AC, Zago MS, Silveira PC, Dal-Pizzol F, Moreira JC. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Int*. 2006;30(10):848-53.

Price JL, Ko AI, Wade MJ, Tsou SK, McKeel DW, Morris JC. Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2001;58(9):1395-402.

Price NL, Gomes AP, Ling AJ, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, Agarwal B, Ye L, Ramadori G, Teodoro JS, Hubbard BP, Varela AT, Davis JG, Varamini B, Hafner A, Moaddel R, Rolo AP, Coppari R, Palmeira CM, de Cabo R, Baur JA, Sinclair DA. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab*. 2012;15(5):675-90.

Prvulovic D, Hampel H. Amyloid β ($A\beta$) and phospho-tau (p-tau) as diagnostic biomarkers in Alzheimer's disease. *Clin Chem Lab Med*. 2011;49(3):367-74.

Purro SA, Dickins EM, Salinas PC. The secreted Wnt antagonist Dickkopf-1 is required for amyloid β -mediated synaptic loss. *J Neurosci*. 2012;32(10):3492-8.

Qin W, Haroutunian V, Katsel P, Cardozo CP, Ho L, Buxbaum JD, Pasinetti GM. PGC-1 α expression decreases in the Alzheimer disease brain as a function of dementia. *Arch Neurol*. 2009;66(3):352-61.

Qin W, Yang T, Ho L, Zhao Z, Wang J, Chen L, Zhao W, Thiyagarajan M, MacGrogan D, Rodgers JT, Puigserver P, Sadoshima J, Deng H, Pedrini S, Gandy S, Sauve AA, Pasinetti GM. Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of Alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction. *J Biol Chem*. 2006;281(31):21745-54.

Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med*. 2008a;44(2):153-9.

Radak Z, Chung HY, Koltai E, Taylor AW, Goto S. Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res Rev*. 2008b;7(1):34-42.

Radák Z, Chung HY, Naito H, Takahashi R, Jung KJ, Kim HJ, Goto S. Age-associated increase in oxidative stress and nuclear factor kappaB activation are attenuated in rat liver by regular exercise. *FASEB J*. 2004;18(6):749-50.

Radak Z, Hart N, Sarga L, Koltai E, Atalay M, Ohno H, Boldogh I. Exercise plays a preventive role against Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2010;20(3):777-83.

Radák Z, Naito H, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Takahashi R, Cardozo-Pelaez F, Goto S. Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *Pflugers Arch*. 2002;445(2):273-8.

Radak Z, Zhao Z, Goto S, Koltai E. Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. *Mol Aspects Med*. 2011;32(4-6):305-15.

Rajawat YS, Hilioti Z, Bossis I. Aging: central role for autophagy and the lysosomal degradative system. *Ageing Res Rev*. 2009;8(3):199-213.

Ramadori G, Lee CE, Bookout AL, Lee S, Williams KW, Anderson J, Elmquist JK, Coppari R. Brain SIRT1: anatomical distribution and regulation by energy availability. *J Neurosci*. 2008;28(40):9989-96.

Ramírez-Rodríguez G, Vega-Rivera NM, Benítez-King G, Castro-García M, Ortiz-López L. Melatonin supplementation delays the decline of adult hippocampal neurogenesis during normal aging of mice. *Neurosci Lett*. 2012;530(1):53-8.

Rattan SI. Hormesis in aging. *Ageing Res Rev*. 2008;7(1):63-78.

- Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, Scaravilli F, Easton DF, Duden R, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet.* 2004;36(6):585-95.
- Real CC, Ferreira AF, Hernandez MS, Britto LR, Pires RS. Exercise-induced plasticity of AMPA-type glutamate receptor subunits in the rat brain. *Brain Res.* 2010;1363:63-71.
- Rector RS, Uptergrove GM, Morris EM, Borengasser SJ, Laughlin MH, Booth FW, Thyfault JP, Ibdah JA. Daily exercise vs. caloric restriction for prevention of nonalcoholic fatty liver disease in the OLETF rat model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;300(5):G874-83.
- Reddy PH, Mani G, Park BS, Jacques J, Murdoch G, Whetsell W Jr, Kaye J, Manczak M. Differential loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: implications for synaptic dysfunction. *J Alzheimers Dis.* 2005;7(2):103-17; discussion 173-80.
- Reznick RM, Zong H, Li J, Morino K, Moore IK, Yu HJ, Liu ZX, Dong J, Mustard KJ, Hawley SA, Befroy D, Pypaert M, Hardie DG, Young LH, Shulman GI. Aging-associated reductions in AMP-activated protein kinase activity and mitochondrial biogenesis. *Cell Metab.* 2007;5(2):151-6.
- Rezzani R, Stacchiotti A, Rodella LF. Morphological and biochemical studies on aging and autophagy. *Ageing Res Rev.* 2012;11(1):10-31.
- Richardson RS, Wagner H, Mudaliar SR, Saucedo E, Henry R, Wagner PD. Exercise adaptation attenuates VEGF gene expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279(2):H772-8.
- Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature.* 2005;434(7029):113-8.
- Rodgers JT, Puigserver P. Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(31):12861-6.
- Rodriguez A, Durán A, Selloum M, Champy MF, Diez-Guerra FJ, Flores JM, Serrano M, Auwerx J, Diaz-Meco MT, Moscat J. Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62. *Cell Metab.* 2006;3(3):211-22.

Rosi MC, Luccarini I, Grossi C, Fiorentini A, Spillantini MG, Prisco A, Scali C, Gianfriddo M, Caricasole A, Terstappen GC, Casamenti F. Increased Dickkopf-1 expression in transgenic mouse models of neurodegenerative disease. *J Neurochem.* 2010;112(6):1539-51.

Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med.* 2004;10 Suppl:S10-7.

Rubinsztein DC, Mariño G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell.* 2011;146(5):682-95.

Ruderman NB, Xu XJ, Nelson L, Cacicedo JM, Saha AK, Lan F, Ido Y. AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;298(4):E751-60.

Ryan NA, Zwetsloot KA, Westerkamp LM, Hickner RC, Pofahl WE, Gavin TP. Lower skeletal muscle capillarization and VEGF expression in aged vs. young men. *J Appl Physiol.* 2006;100(1):178-85.

Sahin E, Depinho RA. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature.* 2010;464(7288):520-8.

Salminen A, Hyttinen JM, Kauppinen A, Kaarniranta K. Context-Dependent Regulation of Autophagy by IKK-NF- κ B Signaling: Impact on the Aging Process. *Int J Cell Biol.* 2012;2012:849541.

Salminen A, Kaarniranta K. Regulation of the aging process by autophagy. *Trends Mol Med.* 2009;15(5):217-24.

Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* 2004;117(3):399-412.

Satoh A, Brace CS, Ben-Josef G, West T, Wozniak DF, Holtzman DM, Herzog ED, Imai S. SIRT1 promotes the central adaptive response to diet restriction through activation of the dorsomedial and lateral nuclei of the hypothalamus. *J Neurosci.* 2010;30(30):10220-32.

- Scali C, Caraci F, Gianfriddo M, Diodato E, Roncarati R, Pollio G, Gaviraghi G, Copani A, Nicoletti F, Terstappen GC, Caricasole A. Inhibition of Wnt signaling, modulation of Tau phosphorylation and induction of neuronal cell death by DKK1. *Neurobiol Dis.* 2006;24(2):254-65.
- Scarmeas N, Luchsinger JA, Brickman AM, Cosentino S, Schupf N, Xin-Tang M, Gu Y, Stern Y. Physical activity and Alzheimer disease course. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2011;19(5):471-81.
- Scarpulla RC. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813(7):1269-78.
- Schenk S, McCurdy CE, Philp A, Chen MZ, Holliday MJ, Bandyopadhyay GK, Osborn O, Baar K, Olefsky JM. Sirt1 enhances skeletal muscle insulin sensitivity in mice during caloric restriction. *J Clin Invest.* 2011;121(11):4281-8.
- Seib DR, Corsini NS, Ellwanger K, Plaas C, Mateos A, Pitzer C, Niehrs C, Celikel T, Martin-Villalba A. Loss of Dickkopf-1 restores neurogenesis in old age and counteracts cognitive decline. *Cell Stem Cell.* 2013;12(2):204-14.
- Settembre C, Fraldi A, Jahreiss L, Spampinato C, Venturi C, Medina D, de Pablo R, Tacchetti C, Rubinsztein DC, Ballabio A. A block of autophagy in lysosomal storage disorders. *Hum Mol Genet.* 2008;17(1):119-29.
- Shetty AK, Hattiangady B, Rao MS, Shuai B. Deafferentation enhances neurogenesis in the young and middle aged hippocampus but not in the aged hippocampus. *Hippocampus.* 2011;21(6):631-46.
- Shibata M, Lu T, Furuya T, Degterev A, Mizushima N, Yoshimori T, MacDonald M, Yankner B, Yuan J. Regulation of intracellular accumulation of mutant Huntingtin by Beclin 1. *J Biol Chem.* 2006;281(20):14474-85.
- Shimada A, Keino H, Satoh M, Kishikawa M, Hosokawa M. Age-related loss of synapses in the frontal cortex of SAMP10 mouse: a model of cerebral degeneration. *Synapse.* 2003;48(4):198-204.
- Shringarpure R, Davies KJ. Protein turnover by the proteasome in aging and disease. *Free Radic Biol Med.* 2002;32(11):1084-9.

- Siu PM, Pei XM, Teng BT, Benzie IF, Ying M, Wong SH. Habitual exercise increases resistance of lymphocytes to oxidant-induced DNA damage by upregulating expression of antioxidant and DNA repairing enzymes. *Exp Physiol*. 2011;96(9):889-906.
- Smith BC, Hallows WC, Denu JM. Mechanisms and molecular probes of sirtuins. *Chem Biol*. 2008;15(10):1002-13.
- Smith PJ, Blumenthal JA, Hoffman BM, Cooper H, Strauman TA, Welsh-Bohmer K, Browndyke JN, Sherwood A. Aerobic exercise and neurocognitive performance: a meta-analytic review of randomized controlled trials. *Psychosom Med*. 2010;72(3):239-52.
- Soontornniyomkij V, Risbrough VB, Young JW, Soontornniyomkij B, Jeste DV, Achim CL. Increased hippocampal accumulation of autophagosomes predicts short-term recognition memory impairment in aged mice. *Age (Dordr)*. 2012;34(2):305-16.
- Spencer JP. Food for thought: the role of dietary flavonoids in enhancing human memory, learning and neuro-cognitive performance. *Proc Nutr Soc*. 2008;67(2):238-52.
- Steiner JL, Murphy EA, McClellan JL, Carmichael MD, Davis JM. Exercise training increases mitochondrial biogenesis in the brain. *J Appl Physiol*. 2011;111(4):1066-71.
- Steiner S, Niessner A, Ziegler S, Richter B, Seidinger D, Pleiner J, Penka M, Wolzt M, Huber K, Wojta J, Minar E, Kopp CW. Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2005;181(2):305-10.
- St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*. 2006;127(2):397-408.
- Stranahan AM, Khalil D, Gould E. Running induces widespread structural alterations in the hippocampus and entorhinal cortex. *Hippocampus*. 2007;17(11):1017-22.
- Stranahan AM, Lee K, Becker KG, Zhang Y, Maudsley S, Martin B, Cutler RG, Mattson MP. Hippocampal gene expression patterns underlying the enhancement of memory by running in aged mice. *Neurobiol Aging*. 2010;31(11):1937-49.

Su Y, Fu C, Ishikawa S, Stella A, Kojima M, Shitoh K, Schreiber EM, Day BW, Liu B. APC is essential for targeting phosphorylated beta-catenin to the SCFbeta-TrCP ubiquitin ligase. *Mol Cell*. 2008;32(5):652-61.

Sun C, Zhang F, Ge X, Yan T, Chen X, Shi X, Zhai Q. SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab*. 2007;6(4):307-19.

Suwa M, Nakano H, Radak Z, Kumagai S. Endurance exercise increases the SIRT1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha protein expressions in rat skeletal muscle. *Metabolism*. 2008;57(7):986-98.

Sydow A, Van der Jeugd A, Zheng F, Ahmed T, Balschun D, Petrova O, Drexler D, Zhou L, Rune G, Mandelkow E, D'Hooge R, Alzheimer C, Mandelkow EM. Tau-induced defects in synaptic plasticity, learning, and memory are reversible in transgenic mice after switching off the toxic Tau mutant. *J Neurosci*. 2011;31(7):2511-25.

T aguchi A, White MF. Insulin-like signaling, nutrient homeostasis, and life span. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:191-212.

Tamagno E, Parola M, Bardini P, Piccini A, Borghi R, Guglielmotto M, Santoro G, Davit A, Danni O, Smith MA, Perry G, Tabaton M. Beta-site APP cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonenal is mediated by stress-activated protein kinases pathways. *J Neurochem*. 2005;92(3):628-36.

Tan JM, Wong ES, Dawson VL, Dawson TM, Lim KL. Lysine 63-linked polyubiquitin potentially partners with p62 to promote the clearance of protein inclusions by autophagy. *Autophagy*. 2008a;4(2):251-253.

Tan JM, Wong ES, Kirkpatrick DS, Pletnikova O, Ko HS, Tay SP, Ho MW, Troncoso J, Gygi SP, Lee MK, Dawson VL, Dawson TM, Lim KL. Lysine 63-linked ubiquitination promotes the formation and autophagic clearance of protein inclusions associated with neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet*. 2008b;17(3):431-9.

Tang BL. Sirt1's complex roles in neuroprotection. *Cell Mol Neurobiol*. 2009;29(8):1093-103.

Tanida I. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(11):2201-14.

Tapia-Arancibia L, Aliaga E, Silhol M, Arancibia S. New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. *Brain Res Rev.* 2008;59(1):201-20.

Tasdemir E, Chiara Maiuri M, Morselli E, Criollo A, D'Amelio M, Djavaheri-Mergny M, Cecconi F, Tavernarakis N, Kroemer G. A dual role of p53 in the control of autophagy. *Autophagy.* 2008a;4(6):810-4.

Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, Criollo A, Morselli E, Zhu C, Harper F, Nannmark U, Samara C, Pinton P, Vicencio JM, Carnuccio R, Moll UM, Madeo F, Paterlini-Brechot P, Rizzuto R, Szabadkai G, Pierron G, Blomgren K, Tavernarakis N, Codogno P, Cecconi F, Kroemer G. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol.* 2008b;10(6):676-87.

Taurin S, Sandbo N, Qin Y, Browning D, Dulin NO. Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 2006;281(15):9971-6.

Titterness AK, Wiebe E, Kwasnica A, Keyes G, Christie BR. Voluntary exercise does not enhance long-term potentiation in the adolescent female dentate gyrus. *Neuroscience.* 2011;183:25-31.

Toledo EM, Colombres M, Inestrosa NC. Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation. *Prog Neurobiol.* 2008;86(3):281-96.

Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci.* 2001;21(5):1628-34.

Trejo JL, Llorens-Martín MV, Torres-Alemán I. The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. *Mol Cell Neurosci.* 2008;37(2):402-11.

Um HS, Kang EB, Koo JH, Kim HT, Jin-Lee, Kim EJ, Yang CH, An GY, Cho IH, Cho JY. Treadmill exercise represses neuronal cell death in an aged transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci Res.* 2011;69(2):161-73.

Van der Borght K, Kóbor-Nyakas DE, Klauke K, Eggen BJ, Nyakas C, Van der Zee EA, Meerlo P. Physical exercise leads to rapid adaptations in hippocampal vasculature: temporal dynamics and relationship to cell proliferation and neurogenesis. *Hippocampus.* 2009;19(10):928-36.

- van Ham TJ, Breitling R, Swertz MA, Nollen EA. Neurodegenerative diseases: Lessons from genome-wide screens in small model organisms. *EMBO Mol Med*. 2009;1(8-9):360-70.
- van Praag H. Exercise and the brain: something to chew on. *Trends Neurosci*. 2009;32(5):283-90.
- van Praag H. Neurogenesis and exercise: past and future directions. *Neuromolecular Med*. 2008;10(2):128-40.
- van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci*. 2005;25(38):8680-5.
- Vasuta C, Caunt C, James R, Samadi S, Schibuk E, Kannangara T, Titterness AK, Christie BR. Effects of exercise on NMDA receptor subunit contributions to bidirectional synaptic plasticity in the mouse dentate gyrus. *Hippocampus*. 2007;17(12):1201-8.
- Vaynman SS, Ying Z, Yin D, Gomez-Pinilla F. Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. *Brain Res*. 2006;1070(1):124-30.
- Venturelli M, Scarsini R, Schena F. Six-month walking program changes cognitive and ADL performance in patients with Alzheimer. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*. 2011;26(5):381-8.
- Verret L, Trouche S, Zerwas M, Rampon C. Hippocampal neurogenesis during normal and pathological aging. *Psychoneuroendocrinology*. 2007;32 Suppl 1:S26-30.
- Vivar C, Potter MC, van Praag H. All about running: synaptic plasticity, growth factors and adult hippocampal neurogenesis. *Curr Top Behav Neurosci*. 2013;15:189-210.
- Wang J, Santa-Maria I, Ho L, Ksiezak-Reding H, Ono K, Teplow DB, Pasinetti GM. Grape derived polyphenols attenuate tau neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2010;22(2):653-61.
- Wang J, Shou J, Chen X. Dickkopf-1, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, is induced by p53. *Oncogene*. 2000;19(14):1843-8.
- Wareski P, Vaarmann A, Choubey V, Safiulina D, Liiv J, Kuum M, Kaasik A. PGC-1 α and PGC-1 β regulate mitochondrial density in neurons. *J Biol Chem*. 2009;284(32):21379-85.

- Waterhouse EG, Xu B. New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity. *Mol Cell Neurosci*. 2009;42(2):81-9.
- Webb JL, Ravikumar B, Rubinsztein DC. Microtubule disruption inhibits autophagosome-lysosome fusion: implications for studying the roles of aggresomes in polyglutamine diseases. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(12):2541-50.
- Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell*. 2008;30(6):678-88.
- Widelitz R. Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: recent progress. *Growth Factors*. 2005;23(2):111-6.
- Wilson RS, Barnes LL, Bennett DA, Li Y, Bienias JL, Mendes de Leon CF, Evans DA. Proneness to psychological distress and risk of Alzheimer disease in a biracial community. *Neurology*. 2005;64(2):380-2.
- Winter B, Breitenstein C, Mooren FC, Voelker K, Fobker M, Lechtermann A, Krueger K, Fromme A, Korsukewitz C, Floel A, Knecht S. High impact running improves learning. *Neurobiol Learn Mem*. 2007;87(4):597-609.
- Wohlgemuth SE, Seo AY, Marzetti E, Lees HA, Leeuwenburgh C. Skeletal muscle autophagy and apoptosis during aging: effects of calorie restriction and life-long exercise. *Exp Gerontol*. 2010;45(2):138-48.
- Wong E, Cuervo AM. Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci*. 2010;13(7):805-11.
- Wu CW, Chang YT, Yu L, Chen HI, Jen CJ, Wu SY, Lo CP, Kuo YM. Exercise enhances the proliferation of neural stem cells and neurite growth and survival of neuronal progenitor cells in dentate gyrus of middle-aged mice. *J Appl Physiol*. 2008;105(5):1585-94.
- X**ie R, Nguyen S, McKeehan WL, Liu L. Acetylated microtubules are required for fusion of autophagosomes with lysosomes. *BMC Cell Biol*. 2010;11:89.

Yang DS, Stavrides P, Mohan PS, Kaushik S, Kumar A, Ohno M, Schmidt SD, Wesson D, Bandyopadhyay U, Jiang Y, Pawlik M, Peterhoff CM, Yang AJ, Wilson DA, St George-Hyslop P, Westaway D, Mathews PM, Levy E, Cuervo AM, Nixon RA. Reversal of autophagy dysfunction in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease ameliorates amyloid pathologies and memory deficits. *Brain*. 2011;134(Pt1):258-77.

Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab*. 2010;11(6):467-78.

Yecies JL, Zhang HH, Menon S, Liu S, Yecies D, Lipovsky AI, Gorgun C, Kwiatkowski DJ, Hotamisligil GS, Lee CH, Manning BD. Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell Metab*. 2011;14(1):21-32.

Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee JH, Mohan PS, Mercken M, Farmery MR, Tjernberg LO, Jiang Y, Duff K, Uchiyama Y, Näslund J, Mathews PM, Cataldo AM, Nixon RA. Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol*. 2005;171(1):87-98.

Yuede CM, Zimmerman SD, Dong H, Kling MJ, Bero AW, Holtzman DM, Timson BF, Csernansky JG. Effects of voluntary and forced exercise on plaque deposition, hippocampal volume, and behavior in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2009;35(3):426-32.

Zalckvar E, Berissi H, Eisenstein M, Kimchi A. Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and Bcl-XL. *Autophagy*. 2009;5(5):720-2.

Zelcer N, Khanlou N, Clare R, Jiang Q, Reed-Geaghan EG, Landreth GE, Vinters HV, Tontonoz P. Attenuation of neuroinflammation and Alzheimer's disease pathology by liver x receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(25):10601-6.

Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J, He X. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature*. 2005;438(7069):873-7.

Zhang F, Wang S, Gan L, Vosler PS, Gao Y, Zigmond MJ, Chen J. Protective effects and mechanisms of sirtuins in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 2011;95(3):373-95.

Zhang Q, Wu Y, Sha H, Zhang P, Jia J, Hu Y, Zhu J. Early exercise affects mitochondrial transcription factors expression after cerebral ischemia in rats. *Int J Mol Sci.* 2012;13(2):1670-9.

Zilka N, Kazmerova Z, Jadhav S, Neradil P, Madari A, Obetkova D, Bugos O, Novak M. Who fans the flames of Alzheimer's disease brains? Misfolded tau on the crossroad of neurodegenerative and inflammatory pathways. *J Neuroinflammation.* 2012;9:47.

Zoladz JA, Pilc A, Majerczak J, Grandys M, Zapart-Bukowska J, Duda K. Endurance training increases plasma brain-derived neurotrophic factor concentration in young healthy men. *J Physiol Pharmacol.* 2008;59 Suppl 7:119-32.

Annex 1



Physiological and behavioural consequences of long-term moderate treadmill exercise

Jaume F. Lalanza^{a,c}, Sandra Sanchez-Roige^a, Humberto Gagliano^b,
Silvia Fuentes^b, Sergi Bayod^{d,e}, Antoni Camins^{d,e}, Mercè Pallàs^{d,e},
Antonio Armario^{b,*}, Rosa M. Escorihuela^{a,**}

^a Institut de Neurociències, Dept. de Psiquiatria i Medicina Legal, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

^b Red de trastornos adictivos (RTA) and Institut de Neurociències, Unitat de Fisiologia Animal, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

^c Departament de Psicologia Bàsica, Evolutiva i de l'Educació, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

^d Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, 08028 Barcelona, Spain

^e Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Spain

Received 22 December 2011; received in revised form 7 March 2012; accepted 8 March 2012

KEYWORDS

Long-term moderate exercise;
Treadmill;
Hole board;
Elevated plus maze;
Open field;
Stress responsiveness;
ACTH;
Corticosterone;
Metabolism

Summary The benefits of long-term moderate exercise for health are widely accepted in humans, but few animal studies have been undertaken to characterize the effects of such activity on emotionality and responsiveness to stress. The present study describes the effects of long-term moderate forced treadmill training (36 weeks) on exploratory activity, anxiety-like behaviour, and the resting or stress levels of some physiological variables, including pituitary-adrenal (PA) hormones. Five-week-old male Sprague-Dawley rats were trained on the treadmill (TM) for 36 weeks, using a more moderate training (12 m/min, 30 min/day, 4–5 days/week) than that currently used in the literature. Two groups were used as controls: a non-handled sedentary (SED) group, receiving no manipulation, and a control (CON) group exposed to a stationary treadmill for the same amount of time as the TM group. In accordance with literature data, TM rats showed lower resting levels of glucose, triglycerides and cholesterol than the other two groups. The TM and CON groups both showed higher ambulation than the SED group in some behavioural tests, without evidence for altered anxiety. Resting levels of adrenocorticotropin (ACTH) and corticosterone did not differ among the groups, but a reduced ACTH response to both a novel environment (mild stressor) and an active escape-avoidance task (severe stressor) was observed in TM rats, whereas changes in corticosterone were modest. The results support the view that the physiological consequences of long-term moderate training are beneficial, including reduced PA responsiveness to stress, even though exercise training did not affect anxiety-like behaviour.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author at: Animal Physiology Unit (Department of Cellular Biology, Physiology and Immunology), School of Biosciences, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain. Tel.: +34 93 5811840; fax: +34 935812390.

** Corresponding author at: Department of Psychiatry and Forensic Medicine, School of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain. Tel.: +34 93 5813296; fax: +34 935811435.

E-mail addresses: antonio.armario@uab.es (A. Armario), rosamaria.escorihuela@uab.cat (R.M. Escorihuela).

1. Introduction

Considerable evidence now supports the idea that an active lifestyle produces benefits for overall health, preventing cardiovascular diseases (Blair and Morris, 2009; Crimi et al., 2009), enhancing cognitive function (Dishman et al., 2006; Kramer et al., 2006; Cotman et al., 2007; van Praag, 2009) and improving mood (Russo-Neustadt et al., 2001; Greenwood et al., 2003; Deslandes et al., 2009; Marais et al., 2009). Exercise has also been associated with a reduced risk of dementia and could help to reduce late-life cognitive impairment (Kramer et al., 1999; Colcombe and Kramer, 2003; Abbott et al., 2004; Weuve et al., 2004), although the oldest age at which starting physical activity can benefit cognition has still not been determined (Bunce and Murden, 2006).

Exercise of moderate intensity for 30 min, five days per week, has been widely recommended for humans (Haskell et al., 2007; Nelson et al., 2007), but there are few studies specifically aimed at characterizing the exercise conditions (intensity and duration) that can produce the most robust effects in both healthy people and those with pathological conditions (Kramer et al., 2006; Rolland et al., 2010). It is unclear the extent to which increased levels of exercise can exert additional healthy effects (Blair et al., 2004), but there is evidence that moderate exercise is better than excessive exercise and over-training in terms of improvement of cardiovascular function, upregulation of the immune system or modulation of redox homeostasis (Radak et al., 2008).

It is well accepted that exercise improves cognition in humans (van Praag, 2009) and most data in animals favour this hypothesis, although the effects are not always consistent. For instance, wheel running in rats for 13 months (from 5 to 18 months of age) showed no protective effect on spatial memory (Hansalik et al., 2006). In contrast, in another study, improvement of age-related impairment of spatial learning and associated cellular mechanisms (long-term potentiation, LTP, in the dentate gyrus) was observed in middle-age rats after 8 months of treadmill training (O'Callaghan et al., 2009). Quite interestingly, in the latter study, the beneficial effect was also observed in the group of animals receiving the same treatment in a stationary treadmill, suggesting a contribution of enriched environmental information acquired by the animals, rather than a specific contribution of exercise.

Less is known about the influence of exercise on emotional reactivity and anxiety-like behaviour in experimental animals. Indeed, to our knowledge, there have been no animal studies about the influence of prolonged periods of exercise (several months) on these two aspects of behaviour. With shorter periods of exercise (1–10 weeks), the results are clearly inconsistent and cannot be explained by the species used (rat or mice), the type of exercise (wheel running vs. treadmill), the period of exposure, or the age of the animals (e.g. Dishman et al., 1996; Fulk et al., 2004; Trejo et al., 2008; García-Capdevila et al., 2009; Fuss et al., 2010). There are two possible reasons for these inconsistencies. First, exercise-trained animals are exposed to handling and other manipulations that can reduce the response to such procedures, as compared to non-trained (sedentary) animals that have not been subjected to the same manipulations. Second, although certain training procedures may initially increase anxiety, this effect may progressively disappear over time,

thereby, making long-lasting exercise training the most appropriate protocol for discovering any real beneficial effects of exercise on anxiety.

Given the critical role of glucocorticoids on cognitive function and aging-associated neurodegeneration (de Kloet et al., 1999), considerable attention has been paid to the influence of exercise on the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis, one of the key systems in the response to stress (Armario, 2006). Although it is well documented that acute exercise can activate the HPA axis, less is known about the influence of long-lasting exercise on resting HPA function, and its responsiveness to additional superimposed stressors. Moreover, all studies have used a relatively short period of training (2–10 weeks). The general pattern is that increases in resting levels of corticosterone can be observed during the first week after wheel running, with normalization after 4 or 8 weeks (Fediuc et al., 2006; Campbell et al., 2009). This pattern results in null or small effects of prolonged periods of exercise on resting levels of HPA hormones, either in rats or mice (Watanabe et al., 1991, 1992; Chennaoui et al., 2002; Droste et al., 2003, 2006, 2007). Regarding the PA response to predominantly emotional stressors, normal (Chennaoui et al., 2002; Droste et al., 2006, 2007) or reduced (Watanabe et al., 1992; Droste et al., 2003) response has usually been reported.

On the basis of the above studies, the main objective of the present work was to characterize the still untested effects of a long-term regular moderate exercise procedure (36 weeks) on exploratory and anxiety behaviour, HPA function, cholesterol and triglyceride levels in adult male rats. The treadmill model was used to administer the same amount and intensity of exercise to the animals throughout the entire period of training, thereby, avoiding the differences described with voluntary running models (Narath et al., 2001; García-Capdevila et al., 2009). Furthermore, an additional control group of rats, which was exposed to the stationary treadmill, was included to rule out a specific influence on the variables of interest, by daily handling and other procedures associated to treadmill exposure.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Sprague-Dawley rats (from the *Servei d'Estabulari, Universitat Autònoma de Barcelona*) were used. They were housed 2 per cage in standard macrolon cages (40 cm in length \times 23 cm in width \times 18 cm in depth) and maintained under 12 h/12 h light/dark cycle (lights on at 08:00 h) in standard conditions of temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity ($50 \pm 10\%$), with free access to food and water. Animals, which were 5 weeks old at the start of the training, were randomly assigned to three groups, balancing the total body weight before starting the training sessions: sedentary (SED, $n = 8$, 95.85 ± 4.8 g), control (CON, $n = 8$, 102.2 ± 5.2 g) and treadmill (TM: $n = 11$, 99.4 ± 3.7 g). The experimental protocol was approved by the Ethics Committee of the *Universitat Autònoma de Barcelona*, and was carried out following the 'Principles of laboratory animal care', in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC).

2.2. Moderate forced treadmill training procedure

Two treadmills were used, each consisting of 3 parallel runways (35 cm × 8 cm × 24 cm, Cibertec, Spain; and 45 cm × 11 cm × 12 cm, Columbus Instruments, USA) without inclination. Training sessions were conducted in the colony room, 4–5 days per week, between 1330 h and 1630 h, and lasted for 30 min. Subjects were habituated to the treadmill for 30 min (0 m/min) on the first day, to minimize novelty-induced stress. Exercise training began gently the day after, and the intensity of the treadmill speed was gradually increased until reaching a maximum intensity of 12 m/min, which was maintained until the end of the experiment. The treadmill (TM) and control (CON) rats were weighed daily before being placed in the treadmill. The CON rats stayed in a stationary treadmill (0 m/min) for the same number of sessions and the same amount of time as the TM rats. The SED rats remained in their own cages and were weighed weekly. Neither electrical shock nor physical prodding was used to motivate the animals. During the first sessions, some animals slowed their gait over the session and displaced towards the back wall of the lane; on such occasions they were gently pushed by hand for a few seconds to stay at the front part of the lane. Despite these cautions, 25% of the rats had to be rejected from the experiment because they refused to run. This percentage is similar to that reported by other authors (Dishman et al., 2000). Rats were trained for 36 weeks, receiving a total of 152 sessions. Behavioural tests were intercalated between the last 20 sessions to avoid training interruption and a possible decrease in the effects of exercise.

2.3. Behavioural procedures

All experiments were performed in a room painted black and illuminated by one 40 W bulb or two 40 W bulbs, in the experiments where the two animals of the same cage were being simultaneously tested on two separate apparatus. The testing battery was administered over five weeks between 09:00 h and 14:00 h (except for basal hormones, see physiological variables) as follows: hole board, day 1; basal hormones, day 3; elevated plus maze, day 7; open field, day 14; and the shuttle box stress test for escape-avoidance behaviour, day 31. Apparatus were cleaned with a 20% ethanol solution after each rat.

2.3.1. Hole-board test

The two hole-board (HB) apparatus were beige wooden boxes (66 cm × 66 cm × 47 cm), with four equidistant holes (3.7 cm diameter, 18 cm deep) on the floor, which were divided into 16 equal squares with red lines. A score was kept of the number of head dips (HD), the time spent head dipping, and the number of crossings. The two animals housed in the same home cage were tested simultaneously, and were recorded by two cameras; each placed 140 cm above one of the two hole-board apparatus. The rat was placed into the centre of the arena and allowed to explore it for 15 min and then, immediately afterwards, blood was taken from each rat by tail nick (see below) in a different room.

2.3.2. Elevated plus maze (EPM)

The EPM consisted of four arms made of black Formica, extending from a 10-cm square centre positioned 90° from each other to form the shape of a plus sign. Each arm was 50 cm long and 10 cm wide. Two opposing arms had wooden walls (enclosed arms, 40 cm high), whereas the other two were open arms with a 0.5 cm ridge to provide additional grip. The whole maze was elevated 50 cm above the floor. The rat was placed in the centre of the maze facing a closed arm, and during the 5 min test the following data were recorded: total entries; entries in open and enclosed arms; time in enclosed and open arms, as well as in the central area; latency to enter for the first time into an open arm; and the number of defecations. An entry was defined as "placing all four paws into a given arm".

2.3.3. Open field (OF)

A 10-min OF session was administered. The two animals of the same home cage were tested simultaneously in two identical apparatus, which each consisted of a white open arena (100 cm × 50 cm × 45 cm) made of white Plexiglas. The animal was placed in the centre of the arena and the distance travelled was measured using video tracking software (View-Point S.A.).

2.3.4. Shuttle box (SB)

Shuttle Box apparatus (Panlab, S.L.) was divided into two equally sized compartments (25 cm × 25 cm) connected by an opening door (8 cm wide and 10 cm high). A trial consisted of simultaneously presenting a light (7 W, 10 s) and a sound (2400 Hz at 40 dB) stimulus, followed immediately by a scrambled electric shock (0.6 mA), which was administered through the metal grid floor of the box. Animals received 30 trials for a period of 30 min, with an inter-trial interval of 15 s.

2.4. Physiological variables

Plasma levels of some physiological variables were measured under resting conditions or in response to stress. Samples were taken by tail nick (ACTH, corticosterone, glucose) or by decapitation (cholesterol, triglycerides). The tail nick was carried out by gently wrapping the animals with a cloth, making a 2-mm incision at the end of the tail vein and then massaging the tail whilst collecting, within 2 min, 300 µl of blood into ice-cold EDTA capillary tubes (Sarsted, Granollers, Spain). The two cage-mated animals were sampled simultaneously by two experimenters in a separate room from the colony room and the testing room.

To evaluate the HPA response to a mild stressor, the animals were exposed for 15 min to the HB in a testing room. Immediately afterwards, the animals were transported to another room and sampled. This time point was chosen because 15 min is the minimum time needed for plasma corticosterone to reflect initial ACTH release (Armario, 2006). To evaluate the HPA axis response to a more severe stressor, the animals were previously exposed to the SB. Immediately after the SB session, and again 30 min after its termination (SB30), rats were sampled by tail nick. Basal samples were taken two days after the HB exposure, on a day when neither behavioural testing nor treadmill training was being undertaken to prevent possible interferences with

hormonal data. Sampling was carried out, under resting conditions, during the morning (09:00–10:00 h) and during the evening (19:00–20:00 h).

2.5. Radioimmunoassays

Plasma ACTH and corticosterone levels were determined by double-antibody radioimmunoassay (RIA). In brief, ACTH RIA used ^{125}I -ACTH (PerkinElmer Life Science, Boston, USA) as the tracer, rat synthetic ACTH 1–39 (Sigma, Barcelona, Spain) as the standard and an antibody raised against rat ACTH (rb7) kindly provided by Dr. W.C. Engeland (Department of Surgery, University of Minnesota, Minneapolis, USA). The characteristics of the antibody have been described previously (Engeland et al., 1989), and we followed a non-equilibrium procedure. Corticosterone RIA used ^{125}I -corticosterone-carboxymethylxime-tyrosine-methyl ester (ICN-Biolink 2000, Barcelona, Spain), synthetic corticosterone (Sigma, Barcelona, Spain) as the standard, and an antibody raised in rabbits against corticosterone-carboxymethylxime-BSA kindly provided by Dr. G. Makara (Institute of Experimental Medicine, Budapest, Hungary). The characteristics of the antibody and the basic RIA procedure have been described previously (Zelena et al., 2003). All samples to be statistically compared were run in the same assay to avoid inter-assay variability. The intra-assay coefficient of variation was 3.8% for ACTH and 7.8% for corticosterone. The sensitivity of the assays was 12.5 pg/ml for ACTH and 0.1 $\mu\text{g}/\text{dl}$ for corticosterone.

2.6. Cholesterol and triglyceride determination

Blood samples for cholesterol and triglyceride determinations were collected in 5% EDTA-tubes at the time of death; plasma was obtained by centrifugation and stored at -80°C until needed. Plasma triglyceride and cholesterol concentrations were measured by using the colorimetric test kits for triglyceride and cholesterol, respectively, from Wako Chemicals GmbH (Neuss, Germany).

2.7. Statistical analysis

The statistical analysis was performed with the 'Statistical Package for Social Sciences' (SPSS, version 17.0), using one-way ANOVA and repeated measures ANOVA. All values are expressed as mean \pm standard error for the mean. All post hoc contrasts were carried out with Bonferroni correction, with $p < 0.05$ considered to be significant.

3. Results

3.1. Body weight

Body weights were analysed by repeated measures ANOVA with treatment as the between-subjects factor and age as the within-subjects factor. The ages included in the analysis were: 4 weeks (pre-exercise), 5 weeks (1 week after treadmill training had started) and 9, 13, 17, 21, 25, 29, and 33 weeks. The analysis indicated (Fig. 1) a significant effect of age [$F(8, 160) = 1857.4$; $p < 0.0001$], but not for group or interaction [$F(2, 20) = 0.64$, ns; age*group: $F(16, 160) = 0.54$, ns; respectively].

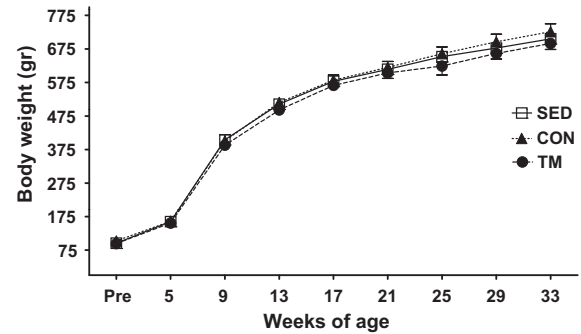


Figure 1 Mean (\pm SEM) of the body weight changes over the weeks of the training period. Groups were: sedentary (SED), control (CON) and treadmill (TM) ($n = 7$ – 8 /group). No significant differences were observed between groups.

3.2. Hole board

A repeated measure ANOVA was used to analyse exploratory behaviour in the HB, with groups as the between-subjects factor and time (3 time bins of 5 min) as the within-subjects factor. The analysis of the number of head dips did not show any significant main effect or interaction [Fig. 2A; group:

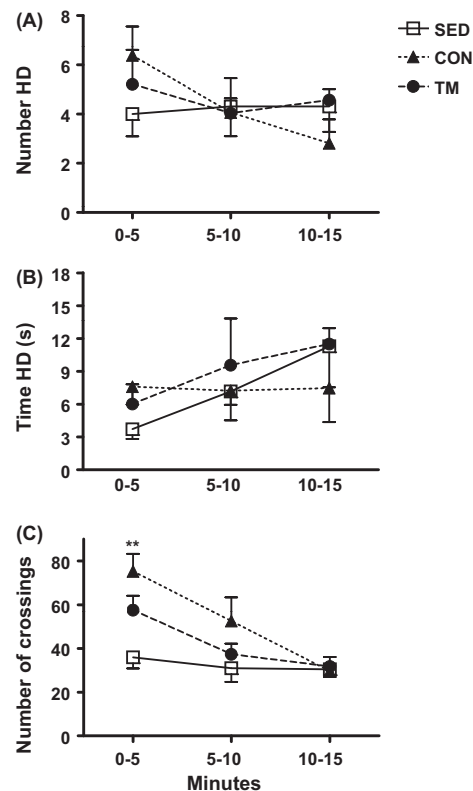


Figure 2 Control group (CON) made more crossings (C) than the sedentary group (SED), during the first 5 min of the hole-board test. Mean \pm SEM of (A) the number of head dips, (B) the time spent head dipping, and (C) the number of crossings are shown over 3 time bins of 5 min in the hole-board test. TM, treadmill group ($n = 7$ – 8 /group). ** $p < 0.01$ vs. SED (Bonferroni).

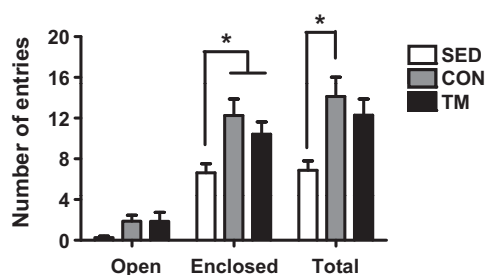


Figure 3 Animals in the sedentary (SED) group showed a reduced number for enclosed and total entries in the elevated plus maze. This figure shows the mean \pm SEM of number of total entries and entries in both open and closed arms. CON, control group; TM, treadmill group ($n = 7-8$ /group). * $p < 0.05$ (Bonferroni) between the indicated groups.

$F(2, 20) = 0.07$; time: $F(2, 40) = 1.79$; group*time: $F(4, 40) = 1.43$]. Time was significant in the analysis of time spent head dipping [Fig. 2B; $F(2, 40) = 3.59$; $p < 0.05$], but not for group and group*time [$F(2, 20) = 0.21$, ns; $F(4, 40) = 1.09$, ns, respectively]. A trend toward significance was found for the effect of group [$F(2, 20) = 3.32$; $p < 0.06$], whereas the significant effects of time [$F(2, 40) = 29.12$; $p < 0.0001$] and interaction group*time [$F(4, 40) = 6.39$; $p < 0.0001$] appeared for the number of crossings (Fig. 2C). Decomposition of that interaction revealed that groups differed during the first 5 min [$F(2, 20) = 9.12$; $p < 0.01$], with the CON group making more crossings than the SED one (Bonferroni, $p < 0.01$; Fig. 2C).

3.3. Elevated plus maze

The one-way ANOVA revealed an overall significant effect for group on the number of total entries, as well as of entries into the closed arms [$F(2, 20) = 6.39$; $p < 0.01$ and $F(2, 20) = 5.23$; $p < 0.05$, respectively]. Animals in the SED group showed reduced activity (Bonferroni, $p < 0.05$) in the EPM in comparison with those in the CON (both measures) and TM (closed arms only) groups (Fig. 3). The time spent in the open [$F(2, 20) = 1.32$, ns] or closed arms [$F(2, 20) = 1.32$, ns], the latency to enter for the first time in an open arm [$F(2, 20) = 2.52$, ns], and the defecation rate [$F(2, 20) = 1.25$, ns] were not affected by handling and/or exercise (data not shown).

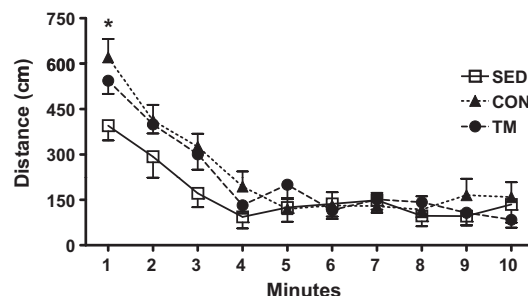


Figure 4 Control (CON) group was more active than the sedentary (SED) group during the first minute of the Open field test. This figure shows the mean \pm SEM of the distance travelled over the 10 min of exposure to the open field test. TM, treadmill group ($n = 7-8$ /group). * $p < 0.05$ vs. SED group (Bonferroni).

3.4. Open field

A repeated measures ANOVA (between-subjects factor: group; within-subjects factor: 10 time bins of 1 min) was used to analyse the distance travelled in the OF. The analysis indicated no significant effect for group [$F(2, 20) = 1.318$, ns], but significant effects for time [$F(9, 180) = 45.12$; $p < 0.0001$] and the group*time interaction [$F(18, 180) = 1.85$; $p < 0.05$] (Fig. 4). Decomposition of that interaction showed that the CON group was more active than SED group during the first minute [$F(2, 20) = 4.98$; $p < 0.05$; post hoc test (Bonferroni): $p = 0.017$] (Fig. 4).

3.5. Physiological variables

3.5.1. Baseline levels

A repeated measures ANOVA (between-subjects factor: group; within-subjects factor: time of the day: morning or evening) was applied to analyse baseline levels of HPA hormones and glucose. A significant time effect was observed for: ACTH [$F(1, 20) = 18.34$; $p < 0.0001$]; corticosterone $F(1, 20) = 73.57$; $p < 0.0001$]; and glucose [$F(1, 19) = 24.48$; $p < 0.0001$]; with higher levels for the three variables in the evening (Fig. 5A–C). A significant effect for group was found for glucose [$F(2, 19) = 4.664$; $p < 0.05$; Fig. 5C], but not for ACTH or corticosterone [$F(2, 20) = 0.669$, ns; $F(2, 20) = 1.694$, ns, respectively]. Further comparisons showed that overall glucose levels of the TM group were significantly

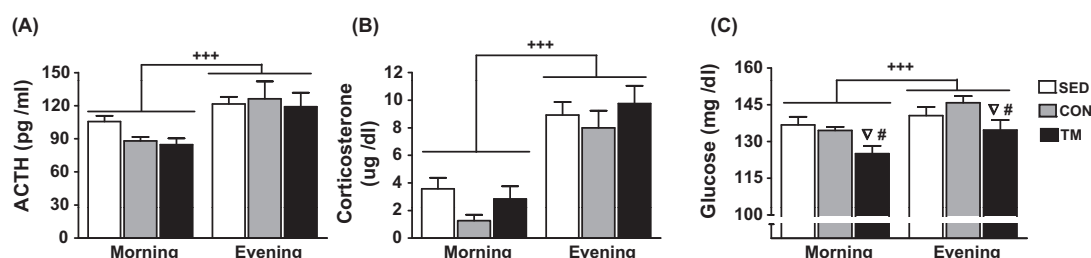


Figure 5 Overall evening levels of ACTH (A), corticosterone (B) and glucose (C) were higher than morning levels. Treadmill group (TM) presented less glucose than sedentary (SED) and control (CON) groups. This figure shows the mean \pm SEM of hormones and glucose levels under resting conditions during the morning and the evening ($n = 7-8$ /group). *** $p < 0.001$ overall time of day effect; $\nabla p < 0.025$, # $p = 0.011$ vs. SED and CON groups, respectively (regardless of time of day).

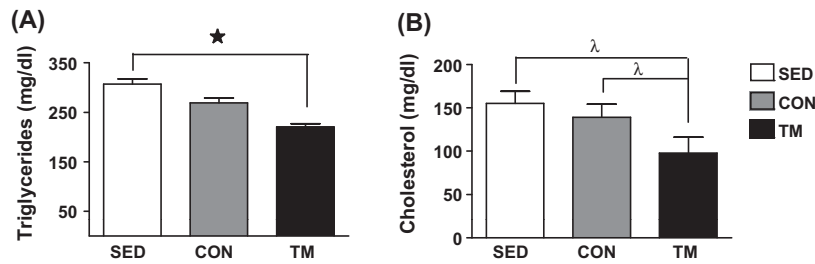


Figure 6 Mean \pm SEM of: (A) triglycerides and (B) cholesterol are shown, both were reduced in the treadmill (TM) group, as compared with the sedentary (SED) and control (CON) groups ($n = 5-6$ /group). * $p < 0.05$ (Bonferroni) between the indicated groups; $\lambda p = 0.065$ vs. SED and $p = 0.085$ vs. CON.

lower than those of the SED ($p = 0.025$) and CON ($p = 0.011$) groups. Group*time interactions were not significant.

One-way ANOVA analysis showed significant differences for measurements of plasma cholesterol and triglycerides [$F(2, 15) = 4.246$; $p < 0.05$ and $F(2, 17) = 3.983$; $p < 0.05$, respectively; Fig. 6A and B]. The TM group showed lower levels of triglycerides than the SED group (Bonferroni, $p < 0.05$). A trend toward significance was found in cholesterol levels of the TM group, as compared to the SED and the CON groups ($p = 0.065$; $p = 0.085$, respectively).

3.5.2. Response to stressors

Plasma glucose was not studied for the HB response, because glucose response is low or null after mild stressors. Analysis of the ACTH and corticosterone responses indicated a significant effect of group for ACTH [$F(2, 20) = 3.59$; $p < 0.05$] (Fig. 7A), but not for corticosterone (Fig. 7B). Further comparisons of ACTH indicated that TM animals showed lower ACTH levels than CON ones (Bonferroni, $p = 0.05$), but they did not differ from SED animals (Fig. 7A).

Behavioural data regarding escape-avoidance behaviour in the SB could not be recorded due to technical problems, but the available data indicate that the number of escapes was similar in the three groups (SED 26.38 ± 1.2 , CON 27.5 ± 0.9 and TM 25.5 ± 2.3 , $p = 0.67$), suggesting that the amount of shocks received were also similar. A repeated measures ANOVA (between-subjects factor: group; within-subjects factor: time SB, SB30) was conducted to analyse the ACTH response to the SB (Fig. 8A), and showed significant effects for time [$F(1, 20) = 237.23$; $p < 0.0001$] and group [$F(2, 20) = 4.63$; $p < 0.05$], but not for interaction group*

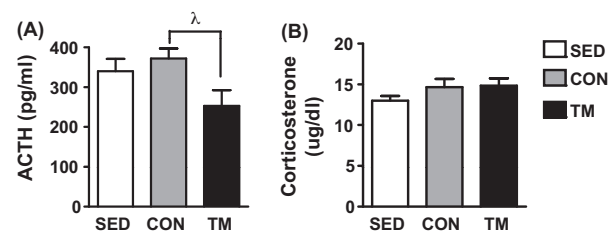


Figure 7 Treadmill (TM) animals presented reduced ACTH levels (A), but not reduced corticosterone levels (B), than the control (CON) group, immediately after exposure to the hole-board test. Means \pm SEM are shown. SED, sedentary group ($n = 7-8$ /group). $\lambda p = 0.05$ (Bonferroni).

time [$F(2, 20) = 0.59$, ns]. Contrast comparisons indicated lower ACTH levels in the TM group, as compared with the SED ($p = 0.07$) and the CON groups ($p = 0.063$) (Fig. 8A). The analysis of corticosterone showed a significant effect for group*time interaction [$F(2, 20) = 4.47$; $p = 0.025$], but no significant effects for group or time [$F(2, 20) < 0.8$, ns] (Fig. 8B). Decomposition of the interaction revealed that the TM group showed a decrease in corticosterone levels, during recovery after shuttle-box stress, whereas the SED and the CON groups did not (Fig. 8B). This decrease was also confirmed by analysis of the difference between SB30 and SB levels for each group (SB30–SB: SED: 4.76 ± 0.87 , CON: 3.06 ± 1.24 , TM: -4.47 ± 3.96) [$F(2, 20) = 4.47$, $p < 0.05$]; post hoc test (Bonferroni, $p = 0.021$) TM < SED. The analyses of glucose showed a significant effect for time [$F(1, 20) = 134.78$;

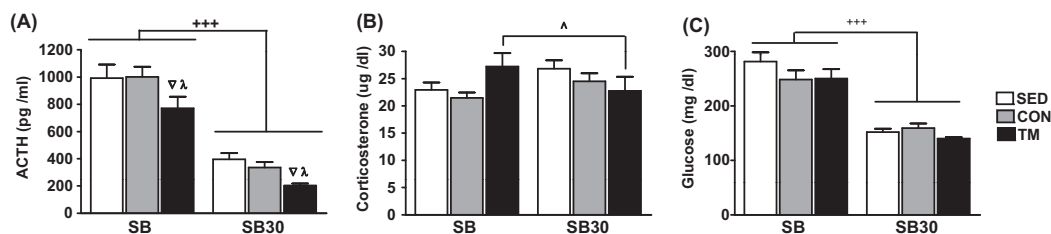


Figure 8 Lower ACTH levels (A) were found in the TM animals, as compared to the sedentary (SED) and control (CON) groups, immediately after the shuttle-box stress session (SB) and after 30 min of recovery (SB30). Corticosterone (B) decreased only in the TM group during the post-shuttle period, and overall levels of glucose (C) decreased after recovery. Mean \pm SEM is shown ($n = 7-8$ /group). *** $p < 0.001$ (general effect of sampling time); $\lambda p < 0.05$ between the indicated groups; $\nabla p = 0.07$ vs. SED and $\lambda p = 0.063$ vs. CON group (regardless of sampling time).

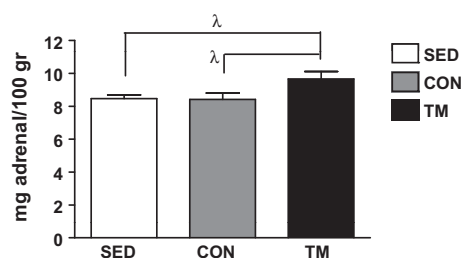


Figure 9 Mean \pm SEM of the relative adrenal weight of sedentary (SED), control (CON) and treadmill (TM) groups ($n = 7-8$ /group). $^{\lambda}p = 0.077$ vs. SED and $p = 0.095$ vs. CON groups.

$p < 0.0001$], which reflected the decrease in glucose levels during the post-SB period (Fig. 8C). There were no significant effects for group or the group*time interaction [$F(2, 20) = 1.17$, ns; $F(2, 20) = 1.58$, ns, respectively].

Finally, the ANOVA revealed a significant effect for group on relative whole adrenal weight (Fig. 9; $F(2, 20) = 3.63$; $p < 0.05$), but comparison of groups (post hoc Bonferroni test) only revealed marginally significant effects: $p = 0.095$ (TM > SED) and $p = 0.077$ (TM > CON).

4. Discussion

The present study is, to our knowledge, one of the first to expose young rats to long-term moderate treadmill exercise (36 weeks) to find out the influence of this exposure on exploratory and anxiety-like behaviour, as well as on the resting and stress levels of some physiological parameters. Two groups of control rats were included, one sedentary (SED) group that always remained in their home cages, and another control (CON) one, exposed to the very same procedure as the treadmill (TM) trained rats, except that they could not run on the treadmill. In this way, a non-specific effect could be ruled out for all the procedures associated to TM regarding anxiety and responsiveness to stress. Hence, our study demonstrates for the first time that long-term moderate training has beneficial physiological effects and reduces the ACTH response to stress. Yet, such beneficial effects are not explained by all procedures associated to training.

The moderate training protocol used in the present study (12 m/min, 30 min/day, 4–5 days/week) did not reduce body weight over the entire period of study. Using the treadmill procedure, body weight reduction has been related to the intensity of training (e.g. Watanabe et al., 1992; Chennaoui et al., 2002; Albeck et al., 2006; Hansalik et al., 2006), and our procedure is milder than all those previously described. Therefore, it appears that treadmill running exercise must be above a certain level of intensity to reduce body weight in rats. Despite the lack of changes in body weight, TM rats showed lower resting levels of glucose, cholesterol and triglycerides than CON and SED groups, a result consistent with previous data obtained in rats (Pels et al., 1985; Suzuki and Machida, 1995) and humans (Martí et al., 1990). As lower levels of these variables have beneficial effects on metabolic and cardiovascular diseases (Eriksson et al., 1997), the present data strongly support the efficacy of our moderate exercise programme.

The behavioural data in the three novel environments (HB, EPM and OF) revealed that, in general, both TM and CON rats increased horizontal activity as compared with SED rats. There were no evident differences between rats in the TM and CON groups. Furthermore, no group differences were observed in variables more specifically related to exploration (head dipping in the HB test) or anxiety-like behaviour (e.g. entries and time in the open arms of the EPM). Hence, our results strongly indicate that there is no specific effect of moderate exercise on activity, exploration or anxiety-like behaviour, and that increased activity may be related to the procedures associated to daily exposure to the treadmill, rather than to exercise per se. Throughout the 36 weeks of training, CON animals were picked up from the home cage, weighed, placed in the treadmill for 30 min and returned to the home cage when the session finished, whereas SED animals were only weighed once per week. The animals of the CON group remained in the apparatus without running, sniffed the surrounding, reared, moved forward and backward in the line, and after some time, sat downward and fell asleep. Thus, CON animals were exposed to some kind of enriched rearing condition, and it has been repeatedly reported that even less intensive and brief handling procedures, as well as other environmental rearing conditions involving increased stimulation, are able to modify activity, exploration or anxiety profiles (Fernandez-Teruel et al., 2002; Leal-Galicia et al., 2008; Pena et al., 2009; Simpson and Kelly, 2011). Moreover, the behavioural similarities between CON and TM rats observed in the present experiments agree with previous studies, which also reported a similar performance by both groups in hippocampal neurotrophin expression, spatial learning, anxiety and social behaviour (Burghardt et al., 2004; O'Callaghan et al., 2009; Spangenberg et al., 2009). In line with this, we have recently reported that both TM and CON rats showed increased serum levels of IGF-1 and brain activation of sirtuin 1 pathway, as compared to SED rats, although the increase was higher in the TM group (Bayod et al., 2011).

Although the research reported in the literature used relatively shorter periods of exercise (1–8 weeks) and more intense training than in the present experiments (when the treadmill was used, allowing comparisons), the effects of exercise on activity in novel environments and on anxiety-like behaviour are clearly inconsistent after treadmill exercise, as well as after voluntary wheel running (e.g. Dishman et al., 1996; Burghardt et al., 2004; Fulk et al., 2004; Leasure and Jones, 2008; Garcia-Capdevila et al., 2009; Grace et al., 2009; Hopkins and Bucci, 2010). More consistent beneficial effects of exercise have been reported when anxiety was enhanced by pharmacological interventions or psychological stress. Wheel running reduced conditioned freezing and reversed the shuttle-box escape deficit produced by uncontrollable stress (Greenwood et al., 2003, 2007), whereas treadmill exercise reversed the increase of anxiety-like behaviour induced by acute sleep deprivation (Volter et al., 2011), and by a drug that increased oxidative stress markers (L-buthionine-(S,R)-sulphoximine (BSO); Salim et al., 2010). Therefore, future research about the possible beneficial effects of exercise on anxiety may benefit from protocols that assess resilience to stress-provoking stimuli.

The analysis of basal hormones showed that TM animals did not differ from the SED and CON groups in plasma ACTH

and corticosterone levels, measured at two points of the circadian cycle. It cannot be ruled out that transient changes appeared during the initial phases of training, which progressively normalized over the long-term period of training (36 weeks). For instance, increases in resting levels of corticosterone during the first week after wheel running, with normalization after 4 or 8 weeks, have been reported (Fediuc et al., 2006; Campbell et al., 2009). Our results concur with those generally reported in the literature, and indicate only null or small effects of exercise on resting levels of HPA hormones, either in rats or mice (Chennaoui et al., 2002; Droste et al., 2003, 2006, 2007; Watanabe et al., 1991, 1992).

To our knowledge, the present study demonstrates for the first time an important impact of long-lasting moderate levels of exercise on PA response to stress. TM animals showed a reduced ACTH response to either a mild stressor (exposure to a novel environment), or a severe stressor (escape-avoidance training using foot shock as the aversive stimulus, SB). That is, the TM group presented a lower ACTH response to stress than both the SED and CON groups. This reduced ACTH response to the escape-avoidance task cannot apparently be explained by a reduced number of shocks related to better learning of the task, as the number of escapes was similar in all groups.

Corticosterone response followed a partially different pattern. No group differences were observed in response to the novel environment. In response to the escape-avoidance task, slightly higher levels were found in TM rats, as compared to SED or CON rats immediately after the task, whereas the post-task decline was greater in TM animals, in accordance with the greater post-task decline in ACTH in these animals. Discrepancies between the ACTH and corticosterone responses can at least be explained in part by enhanced adrenal responsiveness to circulating ACTH in TM rats. These TM rats showed a trend toward a higher relative adrenal weight, and this parameter correlated with maximal adrenocortical responsiveness to ACTH (Marquez et al., 2004).

In general, previous studies on the influence of exercise on PA responsiveness to stress have used much shorter periods of exercise (2–10 weeks), and the results showed normal (Chennaoui et al., 2002; Droste et al., 2006, 2007) or reduced (Droste et al., 2006; Watanabe et al., 1992) ACTH response to predominantly emotional stressors. With these relatively short periods of exercise, it is important to consider the dynamic changes in the HPA axis to adapt to exercise. For instance, Campbell et al. (2009) reported that, after 2 weeks of exercise, rats showed reduced ACTH but higher corticosterone response to restraint stress, whereas a response similar to that of sedentary groups was observed after 8 weeks of exercise. The dissociation between ACTH and corticosterone response after 2 weeks was explained by the observation of enhanced adrenocortical responsiveness to ACTH. Dissociation between both hormones has also been observed in mice exposed to wheel running (Droste et al., 2003, 2006, 2007), suggesting some ACTH-independent specific effect of exercise on adrenocortical function. Moreover, the positive effects of exercise on HPA responsiveness to a stressor may extend beyond the acute response to stressors, as Sasse et al. (2008) observed a normal corticosterone response to noise stress, but a significantly improved habituation to daily repeated noise in exercised animals.

In TM rats, there was no reduced glucose response parallel to the reduction observed in the ACTH response. As stress-induced hyperglycaemia is a reflection of adrenaline release (Marti and Armario, 1998), it can be tentatively assumed that long-lasting moderate training did not substantially modify medullo-adrenal responsiveness to predominantly emotional stressors. However, there are other alternative possibilities. First, exercise-induced metabolic changes may alter glucose metabolism, independently of circulating levels of adrenaline. Second, a reduced ACTH response to stress in TM rats may be the consequence of an altered regulation of the HPA axis in the pituitary, the PVN or above, rather than a reflection of a generalized lower response to stressors. The present results concur with previous reports that 8–10 weeks of treadmill training do not have effects on the noradrenaline and adrenaline response to noise stress (Overton et al., 1991), although it is possible that exercise can be beneficial for reducing noradrenaline and adrenaline response to stress in certain vulnerable animals, such as borderline hypertensive rats (Cox, 1991).

In conclusion, moderate forced exercise practiced from early ages has an important long-term impact in adulthood. Exercise, but not handling, reduced plasma levels of glucose, cholesterol and triglycerides, suggesting beneficial metabolic consequences. The two components involved in the treadmill training procedure, handling and exercise, can affect behaviour and responsiveness to stress in a different manner. Treadmill handling increased horizontal activity, but did not affect anxiety. Although any treatment altered basal hormone levels, the present study is probably the first to demonstrate that long-term moderate treadmill exercise, but not the handling procedures, reduces the ACTH response to both mild and severe stress challenges.

Role of the funding source

The funding sources (cited in the acknowledgements section) had no further role in the study or in the writing of this article.

Conflict of interest statement

All authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by Ministerio de Educacion y Ciencia (PSI 2008-06417-C03-01,02, 03, SAF2008-01175 and SAF-2009-13093), Instituto de Salud Carlos III (DPS2008-06998-C01,C02 and RD06/0001/0015), Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud, and Generalitat de Catalunya (SGR2009-16, 2009/SGR00893). J.F.L. was supported by a predoctoral fellowship from the Generalitat de Catalunya (FI-DGR 2011).

References

- Abbott, R.D., White, L.R., Ross, G.W., Masaki, K.H., Curb, J.D., Petrovitch, H., 2004. Walking and dementia in physically capable elderly men. *JAMA: J. Am. Med. Assoc.* 292, 1447–1453.

- Albeck, D.S., Sano, K., Prewitt, G.E., Dalton, L., 2006. Mild forced treadmill exercise enhances spatial learning in the aged rat. *Behav. Brain Res.* 168, 345–348.
- Armario, A., 2006. The hypothalamic–pituitary–adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 5, 485–501.
- Bayod, S., Del Valle, J., Canudas, A.M., Lalanza, J.F., Sanchez-Roige, S., Camins, A., Escorihuela, R.M., Pallas, M., 2011. Long-term treadmill exercise induces neuroprotective molecular changes in rat brain. *J. Appl. Physiol.* 111, 1380–1390.
- Blair, S., LaMonte, M., Nichaman, M., 2004. The evolution of physical activity recommendations: how much is enough? *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 913–920.
- Blair, S.N., Morris, J.N., 2009. Healthy hearts – and the universal benefits of being physically active: physical activity and health. *Ann. Epidemiol.* 19, 253–256.
- Bunce, D., Murden, F., 2006. Age, aerobic fitness, executive function, and episodic memory. *Eur. J. Cogn. Psychol.* 18, 221–233.
- Burghardt, P.R., Fulk, L.J., Hand, G.A., Wilson, M.A., 2004. The effects of chronic treadmill and wheel running on behavior in rats. *Brain Res.* 1019, 84–96.
- Campbell, J.E., Rakhshani, N., Fediuc, S., Bruni, S., Riddell, M.C., 2009. Voluntary wheel running initially increases adrenal sensitivity to adrenocorticotrophic hormone, which is attenuated with long-term training. *J. Appl. Physiol.* 106, 66–72.
- Chennaoui, M., Merino, D.G., Lesage, J., Drogou, C., Guezennec, C.Y., 2002. Effects of moderate and intensive training on the hypothalamo–pituitary–adrenal axis in rats. *Acta Physiol. Scand.* 175, 113–121.
- Colcombe, S., Kramer, A.F., 2003. Fitness effects on the cognitive function of older adults: a meta-analytic study. *Psychol. Sci.* 14, 125–130.
- Cotman, C.W., Berchtold, N.C., Christie, L., 2007. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci.* 30, 464–472.
- Cox, R., 1991. Exercise training and response to stress – insights from an animal-model. *Med. Sci. Sports Exerc.* 13, 853–859.
- Crimi, E., Ignarro, L.J., Cacciatore, F., Napoli, C., 2009. Mechanisms by which exercise training benefits patients with heart failure. *Nat. Rev. Cardiol.* 6, 292–300.
- de Kloet, E., Oitzl, M., Joels, M., 1999. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci.* 22, 422–426.
- Deslandes, A., Moraes, H., Ferreira, C., Veiga, H., Silveira, H., Mouta, R., Pompeu, F.A.M.S., Freire Coutinho, E.S., Laks, J., 2009. Exercise and mental health: many reasons to move. *Neuropsychobiology* 59, 191–198.
- Dishman, R.K., Dunn, A.L., Youngstedt, S.D., Davis, J.M., Wilson, S.P., Wilson, M.A., 1996. Increased open field locomotion and decreased striatal GABA binding after activity wheel running. *Physiol. Behav.* 60, 699–705.
- Dishman, R.K., Renner, K.J., White-Welkley, J.E., Burke, K.A., Bunnell, B.N., 2000. Treadmill exercise training augments brain norepinephrine response to familiar and novel stress. *Brain Res. Bull.* 52, 337–342.
- Dishman, R.K., Berthoud, H., Booth, F.W., Cotman, C.W., Edgerton, V.R., Fleshner, M.R., Gandevia, S.C., Gomez-Pinilla, F., Greenwood, B.N., Hillman, C.H., Kramer, A.F., Levin, B.E., Moran, T.H., Russo-Neustadt, A.A., Salamone, J.D., Van Hoomissen, J.D., Wade, C.E., York, D.A., Zigmond, M.J., 2006. Neurobiology of exercise. *Obesity* 14, 345–356.
- Droste, S.K., Schweizer, M.C., Ulbricht, S., Reul, J.M.H.M., 2006. Long-term voluntary exercise and the mouse hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis: impact of concurrent treatment with the antidepressant drug tianeptine. *J. Neuroendocrinol.* 18, 915–925.
- Droste, S.K., Gesing, A., Ulbricht, S., Muller, M.B., Linthorst, A.C.E., Reul, J.M.H.M., 2003. Effects of long-term voluntary exercise on the mouse hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis. *Endocrinology* 144, 3012–3023.
- Droste, S.K., Chandramohan, Y., Hill, L.E., Linthorst, A.C.E., Reul, J.M.H.M., 2007. Voluntary exercise impacts on the rat hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis mainly at the adrenal level. *Neuroendocrinology* 86, 26–37.
- Eriksson, J., Taimela, S., Koivisto, V.A., 1997. Exercise and the metabolic syndrome. *Diabetologia* 40, 125–135.
- Engeland, W.C., Miller, P., Gann, D.S., 1989. Dissociation between changes in plasma bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin after hemorrhage in awake dogs. *Endocrinology* 124, 2978–2985.
- Fediuc, S., Campbell, J.E., Riddell, M.C., 2006. Effect of voluntary wheel running on circadian corticosterone release and on HPA axis responsiveness to restraint stress in Sprague-Dawley rats. *J. Appl. Physiol.* 100, 1867–1875.
- Fernandez-Teruel, A., Gimenez-Llort, L., Escorihuela, R.M., Gil, L., Aguilar, R., Steimer, T., Tobena, A., 2002. Early-life handling stimulation and environmental enrichment – are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 233–245.
- Fulk, L.J., Stock, H.S., Lynn, A., Marshall, J., Wilson, M.A., Hand, G.A., 2004. Chronic physical exercise reduces anxiety-like behavior in rats. *Int. J. Sports Med.* 25, 78–82.
- Fuss, J., Ben Abdallah, N.M., Vogt, M.A., Touma, C., Pacifici, P.G., Palme, R., Witzemann, V., Hellweg, R., Gass, P., 2010. Voluntary exercise induces anxiety-like behavior in adult C57BL/6J mice correlating with hippocampal neurogenesis. *Hippocampus* 20, 364–376.
- García-Capdevila, S., Portell-Cortés, I., Torras-Garcia, M., Coll-Andreu, M., Costa-Miserachs, D., 2009. Effects of long-term voluntary exercise on learning and memory processes: dependency of the task and level of exercise. *Behav. Brain Res.* 202, 162–170.
- Grace, L., Heschem, S., Kellaway, L.A., Bugarith, K., Russell, V.A., 2009. Effect of exercise on learning and memory in a rat model of developmental stress. *Metab. Brain Dis.* 24, 643–657.
- Greenwood, B.N., Foley, T.E., Day, H.E.W., Campisi, J., Hammack, S.H., Campeau, S., Maier, S.F., Fleshner, M., 2003. Free wheel running prevents learned helplessness/behavioral depression: role of dorsal raphe serotonergic neurons. *J. Neurosci.* 23, 2889–2898.
- Greenwood, B.N., Strong, P.V., Dorey, A.A., Fleshner, M., 2007. Therapeutic effects of exercise: wheel running reverses stress-induced interference with shuttle box escape. *Behav. Neurosci.* 121, 992–1000.
- Hansalik, M., Skalicky, M., Viidik, A., 2006. Impairment of water maze behaviour with ageing is counteracted by maze learning earlier in life but not by physical exercise, food restriction or housing conditions. *Exp. Gerontol.* 41, 169–174.
- Haskell, W.L., Lee, I., Pate, R.R., Powell, K.E., Blair, S.N., Franklin, B.A., Macera, C.A., Heath, G.W., Thompson, P.D., Bauman, A., 2007. Physical activity and public health – updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation* 116, 1081–1093.
- Hopkins, M.E., Bucci, D.J., 2010. BDNF expression in perirhinal cortex is associated with exercise-induced improvement in object recognition memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 94, 278–284.
- Kramer, A.F., Hahn, S., Cohen, N.J., Banich, M.T., McAuley, E., Harrison, C.R., Chason, J., Vakil, E., Bardell, L., Boileau, R.A., Colcombe, A., 1999. Ageing, fitness and neurocognitive function. *Nature* 400, 418–419.
- Kramer, A.F., Erickson, K.I., Colcombe, S.J., 2006. Exercise, cognition, and the aging brain. *J. Appl. Physiol.* 101, 1237–1242.
- Leal-Galicia, P., Castaneda-Bueno, M., Quiroz-Baez, R., Arias, C., 2008. Long-term exposure to environmental enrichment since youth prevents recognition memory decline and increases synap-

- tic plasticity markers in aging. *Neurobiol. Learn. Mem.* 90, 511–518.
- Leasure, J.L., Jones, M., 2008. Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. *Neuroscience* 156, 456–465.
- Marais, L., Stein, D.J., Daniels, W.M.U., 2009. Exercise increases BDNF levels in the striatum and decreases depressive-like behavior in chronically stressed rats. *Metab. Brain Dis.* 24, 587–597.
- Marquez, C., Nadal, R., Armario, A., 2004. The hypothalamic–pituitary–adrenal and glucose responses to daily repeated immobilisation stress in rats: individual differences. *Neuroscience* 123, 601–612.
- Martí, B., Suter, E., Riesen, W.F., Tschopp, A., Wanner, H.U., Gutzwiller, F., 1990. Effects of long-term, self-monitored exercise on the serum lipoprotein and apolipoprotein profile in middle-aged men. *Atherosclerosis* 81, 19–31.
- Marti, O., Armario, A., 1998. Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *Int. J. Dev. Neurosci.* 16, 241–260.
- Narath, E., Skalicky, M., Viidik, A., 2001. Voluntary and forced exercise influence the survival and body composition of ageing male rats differently. *Exp. Gerontol.* 36, 1699–1711.
- Nelson, M.E., Rejeski, W.J., Blair, S.N., Duncan, P.W., Judge, J.O., King, A.C., Macera, C.A., Castaneda-Sceppa, C., 2007. Physical activity and public health in older adults: recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med. Sci. Sports Exerc.* 39, 1435–1445.
- O’Callaghan, R.M., Griffin, E.W., Kelly, A.M., 2009. Long-term treadmill exposure protects against age-related neurodegenerative change in the rat hippocampus. *Hippocampus* 19, 1019–1029.
- Overton, J., Kregel, K., Davisgorman, G., Seals, D., Tipton, C., Fisher, L., 1991. Effects of exercise training on responses to central injection of Crf and noise stress. *Physiol. Behav.* 49, 93–98.
- Pels, A., White, T., Block, W., 1985. Effects of exercise training on plasma-lipids and lipoproteins in rats. *J. Appl. Physiol.* 58, 612–618.
- Pena, Y., Prunell, M., Rotllant, D., Armario, A., Escorihuela, R.M., 2009. Enduring effects of environmental enrichment from weaning to adulthood on pituitary–adrenal function, pre-pulse inhibition and learning in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology* 34, 1390–1404.
- Radak, Z., Chung, H.Y., Koltai, E., Taylor, A.W., Goto, S., 2008. Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res. Rev.* 7, 34–42.
- Rolland, Y., van Kan, G.A., Vellas, B., 2010. Healthy brain aging: role of exercise and physical activity. *Clin. Geriatr. Med.* 26, 75–87.
- Russo-Neustadt, A., Ha, T., Ramirez, R., Kesslak, J.P., 2001. Physical activity-antidepressant treatment combination: impact on brain-derived neurotrophic factor and behavior in an animal model. *Behav. Brain Res.* 120, 87–95.
- Salim, S., Sarraj, N., Taneja, M., Saha, K., Tejada-Simon, M.V., Chugh, G., 2010. Moderate treadmill exercise prevents oxidative stress-induced anxiety-like behavior in rats. *Behav. Brain Res.* 208, 545–552.
- Sasse, S.K., Greenwood, B.N., Masini, C.V., Nyhuis, T.J., Fleshner, M., Day, H.E.W., Campeau, S., 2008. Chronic voluntary wheel running facilitates corticosterone response habituation to repeated audiogenic stress exposure in male rats. *Stress* 11, 425–437.
- Simpson, J., Kelly, J.P., 2011. The impact of environmental enrichment in laboratory rats – behavioural and neurochemical aspects. *Behav. Brain Res.* 222, 246–264.
- Spangenberg, E., Dahlborn, K., Essen-Gustavsson, B., Cvek, K., 2009. Effects of physical activity and group size on animal welfare in laboratory rats. *Anim. Welf.* 18, 159–169.
- Suzuki, K., Machida, K., 1995. Effectiveness of lower-level voluntary exercise in disease prevention of mature rats. 1: cardiovascular risk factor modification. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 71, 240–244.
- Trejo, J.L., Lorens-Martin, M.V., Torres-Aleman, I., 2008. The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* 37, 402–411.
- van Praag, H., 2009. Exercise and the brain: something to chew on. *Trends Neurosci.* 32, 283–290.
- Vollert, C., Zagaar, M., Hovatta, I., Taneja, M., Vu, A., Dao, A., et al., 2011. Exercise prevents sleep deprivation-associated anxiety-like behavior in rats: potential role of oxidative stress mechanisms. *Behav. Brain Res.* 224, 233–240.
- Watanabe, T., Morimoto, A., Sakata, Y., Wada, M., Murakami, N., 1991. The effect of chronic exercise on the pituitary adrenocortical-response in conscious rats. *J. Physiol. London* 439, 691–699.
- Watanabe, T., Morimoto, A., Sakata, Y., Tan, N., Morimoto, K., Murakami, N., 1992. Running training attenuates the Acth responses in rats to swimming and cage-switch stress. *J. Appl. Physiol.* 73, 2452–2456.
- Weuve, J., Kang, J.H., Manson, J.E., Breteler, M.M.B., Ware, J.H., Grodstein, F., 2004. Physical activity, including walking, and cognitive function in older women. *JAMA: J. Am. Med. Assoc.* 292, 1454–1461.
- Zelena, D., Mergl, Z., Foldes, A., Kovacs, K.J., Toth, Z., Makara, G.B., 2003. Role of hypothalamic inputs in maintaining pituitary–adrenal responsiveness in repeated restraint. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, E1110–E1117.

